

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**PODOPLANINA ES UN COMPONENTE DE  
VESÍCULAS EXTRACELULARES QUE  
REPROGRAMA EL CONTENIDO PROTEICO DE  
EXOSOMAS Y MODULA LA FORMACIÓN DE  
VASOS LINFÁTICOS**

PATRICIA CARRASCO RAMÍREZ

Madrid, 2016



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



# PODOPLANINA ES UN COMPONENTE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES QUE REPROGRAMA EL CONTENIDO PROTEICO DE EXOSOMAS Y MODULA LA FORMACIÓN DE VASOS LINFÁTICOS

Memoria presentada por

**PATRICIA CARRASCO RAMÍREZ**

Licenciada en Biotecnología, para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid

Realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) bajo  
la dirección del Dr. Miguel Quintanilla Ávila.





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

**Dr. Miguel Quintanilla Ávila**, profesor de investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), y profesor honorario de la Universidad Autónoma de Madrid.

#### CERTIFICA

Que Dña. Patricia Carrasco Ramírez, Licenciada en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria (Madrid), ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis que lleva por título: “**PODOPLANINA ES UN COMPONENTE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES QUE REPROGRAMA EL CONTENIDO PROTEICO DE EXOSOMAS Y MODULA LA FORMACIÓN DE VASOS LINFÁTICOS**”, y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

EL DIRECTOR,

Fdo. Miguel Quintanilla Ávila



## AGRADECIMIENTOS

*Después de 6 años de trabajo, vienen a mi mente muchas personas a las que quiero agradecer su contribución, ayuda y apoyo ya sea en el plano profesional o en el personal sin vosotros no lo hubiera conseguido. En primer lugar me gustaría agradecer a Miguel la confianza que ha depositado en mí en estos años, por darme la oportunidad de desarrollarme personalmente y profesionalmente como “científica”. Sin olvidarme de Jaime porque para mí eres otro director más, ayudándome y apoyándome siempre que lo necesité. A Manuel Izquierdo y a Héctor Peinado por su gran ayuda durante nuestros primeros pasos en el campo de las vesículas.*

*Por supuesto, a todas mis compañeros del 1.12 por los buenos momentos y por vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Los recuerdos que me llevo de vosotras son inolvidables y me considero afortunada por contar con vuestra amistad. Dar las gracias a María, aunque se cierre una etapa después de 6 años todavía nos queda muchos momentos por vivir juntas. Ester, gracias por estar siempre ahí aunque a veces te hayamos sacado un poco de quicio en el laboratorio pero siempre serás una referencia para poder seguir trabajando por lo que tanto me gusta a pesar de las dificultades. A ti Lucía decirte que aproveches cada uno de los días en el laboratorio y desearte lo mejor en esta etapa tan bonita. Eli no cambies nunca, eres un ejemplo de que con esfuerzo todo se puede conseguir y llegarás muy lejos. A mi doctor preferido Andrés, espero seguir viéndote por aquí y antes de que te vayas Istefani quiero aprender a bailar samba. Gracias también a todas las personas que durante estos 6 años han ido pasando por el laboratorio.*

*Como me voy a olvidar de mis vecinas del 1.11 y mis nuevas compañeras, por esos ratos de descanso con un café y una buena charla, en especial a ti Laura, espero que siga habiendo muchos más y que la próxima seas tú. Tampoco me puedo olvidar del laboratorio de Alberto Muñoz, en especial de Gema por ser igual de desastre que yo, todo era más fácil porque siempre éramos dos. Dar las gracias al laboratorio 109 del CIB, a Luisa y a Virginia por su apoyo y ayuda en los últimos experimentos de mi trabajo. En general a todas las personas que forman parte del iib, os echaré de menos allí donde esté. Durante este tiempo, he conocido a mucha gente que nunca podré olvidar, os deseo lo mejor... RECUERDA: ayer, hoy, mañana y SIEMPRE...*

*Nunca me podré olvidar de todos esos viajes que hicimos juntas por Australia, fue un placer conocerte Laura y espero que volvamos a coincidir de nuevo. Muchas gracias*

*también al Dr. Richard Simpson, de La Trobe University en Australia, y a todo su equipo por acogerme como a una más, porque nunca me sentí sola aunque estuviera tan lejos.*

*Que puedo decir de mis chicas que habéis estado siempre hay, mil gracias por todo, sobre todo por aguantarme que sé que a veces puedo ser un poco cabezota pero siempre estáis ahí. Leti quiero que sepas que eres un pilar muy importante en mi vida, que hemos pasado muchas cosas juntas y siempre que te he necesitado estabas ahí, creo que no puedo pedir más, que aunque los últimos meses no hayan sido los mejores, sé que nos espera algo bueno. Por supuesto a todas las amigas de Madrid por haberme acogido como a una más y que todavía nos queda mucho por vivir juntas. A todas mis chicas de la uni y a mi chico también, que os quiero muchoooo y por muchos años más.*

*Por supuesto, agradecer a mis padres todo el apoyo y los esfuerzos que han hecho para que mi hermano y yo tuviésemos la oportunidad de aprender y hacer lo que siempre nos ha gustado. ¡No puedo haber tenido mejor modelo en mi vida! Mil gracias, sin vosotros, yo no hubiera llegado hasta aquí. Que voy a decir de ti hermanito, que estoy muy orgullosa de ti y gracias por estar siempre a mi lado. Os quiero.*

**¡¡¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!**



---

“Sólo una cosa vuelve un sueño  
imposible: el miedo a fracasar”

**Pablo Coelho**

---



## RESUMEN

Podoplanina (PDPN) es una glicoproteína transmembrana tipo mucina que juega un papel crucial en el desarrollo embrionario y la respuesta inmune. PDPN promueve la migración, invasión y metástasis tumoral. En este trabajo, hemos identificado que PDPN es secretada al medio extracelular asociada a los dos tipos principales de vesículas extracelulares (EVs): microvesículas (MVs) y exosomas (EXOs). Un análisis por RT-PCR indica que, además de la proteína, los EXOs incorporan el mRNA de PDPN. Por otro lado, resultados de esta Tesis sugieren que EXOs que contienen PDPN son liberados *in vivo* por tumores inducidos por células de carcinoma en ratones atímicos.

PDPN induce en células MDCK una transición epitelio-mesénquima (EMT), asociada con la pérdida de cadherina E (y marcadores epiteliales) y la inducción de cadherina N (y marcadores mesenquimáticos). Hemos realizado un estudio de proteómica diferencial, tanto en células MDCK-PDPN y MDCK-CMV (control), como en EXOs purificados del medio condicionado de estas líneas celulares. El análisis proteómico en células muestra que la inducción de una EMT por PDPN en MDCK está asociada con un aumento de la expresión de proteínas pro-oncogénicas y una disminución de la expresión de proteínas supresoras tumorales, lo que explica la relación directa de PDPN con la tumorigenicidad, ejemplificada por la drástica reducción de la capacidad tumorigénica de células de carcinoma oral HN5 en las que la expresión de PDPN fue silenciada mediante interferencia con shRNA. El análisis proteómico en EXOs reveló que EXOs-PDPN derivados de MDCK-PDPN estaban enriquecidos en proteínas implicadas en la adhesión celular y la remodelación del citoesqueleto, la transducción de señales y, de forma llamativa, el tráfico intracelular y la biogénesis de EVs. Nuestros datos sugieren que PDPN estimula la producción tanto de EXOs como MVs.

Finalmente, estudios preliminares encaminados a determinar la relevancia biológica de EXOs que contienen PDPN sugieren que, tanto EXOs-PDPN como EXOs-CMV control estimulan la angiogénesis *in vitro*, mientras que sólo los EXOs-PDPN fueron capaces de estimular la linfangiogénesis. Por otro lado, heridas realizadas en ratones atímicos tratados con EXOs-PDPN tendieron a cicatrizar más rápidamente que las tratadas con EXOs-CMV.



## SUMMARY

Podoplanin (PDPN) is a transmembrane glycoprotein that plays crucial roles in embryonic development and the immune response. PDPN promotes tumor cell migration, invasion, and metastasis. In this work, we identified that PDPN is secreted into the extracellular medium associated with the two main types of extracellular vesicles (EVs): microvesicles (MVs) and exosomes (EXOs). Besides the protein, the PDPN mRNA is also incorporated into EXOs, as shown by RT-PCR. On the other hand, our results indicate that PDPN-containing EXOs are secreted *In vivo* by tumours induced by carcinoma cells in athymic nude mice.

PDPN induces an EMT in MDCK cells associated with loss of E-cadherin (and other epithelial markers) and induction of N-cadherin (and mesenchymal markers). We have performed a differential proteomic analysis in whole MDCK-PDPN and MDCK-CMV (control) cells and derived EXOs. The cellular proteomic analysis shows that PDPN-induced EMT is associated with upregulation of pro-oncogenic proteins and diminished expression of tumor suppressors. These results explain the direct relationship between PDPN and tumorigenicity, exemplified by the drastic reduction of the tumorigenic potential of human HN5 squamous carcinoma cells after PDPN knockdown by shRNA interference. Proteomic analysis of EXOs revealed that PDPN-containing EXOs are enriched in protein cargos involved in cell adhesion and cytoskeletal remodeling, signal transduction and, importantly, intracellular trafficking and EV biogenesis. Accordingly, we present experimental evidence suggesting that PDPN stimulates the production of both EXOs and MVs.

Finally, preliminary studies aimed to establish the biological relevance of PDPN-containing EXOs suggest that EXOs-PDPN and control EXOs-CMV both stimulate *in vitro* angiogenesis, but only EXOs-PDPN were able to stimulate lymphangiogenesis. Furthermore, full-thickness wounds performed in athymic nude mice treated with EXOs-PDPN tend to heal faster than those treated with EXOs-CMV.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES, UN NUEVO MECANISMO DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR	9
1.1 Exosomas y Microvesículas	9
1.2 Composición molecular de los exosomas	11
1.3 Biogénesis de los exosomas	12
1.3.1 Formación de vesículas intraluminales	12
1.3.2 Mecanismos de la biogénesis de exosomas dependientes e independientes del complejo ESCRT	13
1.3.3 Liberación de las vesículas intraluminales	15
1.4 Biogénesis de microvesículas	15
1.5 Funciones de vesículas extracelulares	16
1.5.1 Función en el cáncer	17
2. PODOPLANINA	19
2.1 Estructura	19
2.2 Expresión en tejidos normales	21
2.3 Expresión en tumores	21
2.4 Interacción con otras proteínas	22
2.4.1 CLEC-2	22
2.4.2 CD9	23
2.4.3 Galectina-8	23
2.4.1 CD44	23
2.4.5 Ezrina y moesina	24
2.4.6 Otras proteínas (CCL21 y HSPA9)	24
2.5 Función biológica de podoplanina	25
2.5.1 Podoplanina en el desarrollo embrionario	25
2.5.2 Función de podoplanina en el sistema inmune	25
2.5.3 Función de podoplanina en el cáncer	26
2.5.4 Podoplanina y la Transición Epitelio-Mesénquima	27
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>

1. Cultivos celulares, transfecciones e interferencia de RNA	35
2. Aislamiento, purificación e identificación de vesículas extracelulares	36
2.1 Aislamiento de microvesículas y de la fracción cruda de exosomas	36
2.2 Purificación de exosomas mediante un gradiente de densidad en Optiprep™	36
2.3 Cuantificación de vesículas	37
3. Caracterización de exosomas mediante microscopia electrónica e inmunomarcaje con oro coloidal	37
4. Dispersión dinámica de la luz ("Dynamic Light Scattering", DLS)	39
5. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western blot	39
6. Análisis de la localización intracelular de proteínas mediante inmunofluorescencia	40
7. Análisis de la internalización de podoplanina mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal	42
8. Captura de vesículas mediante inmunopartículas magnéticas	42
9. Ensayos de proliferación celular (MTT)	42
10. Ensayos de viabilidad celular con azul tripán	43
11. Análisis de la expresión de mRNA de podoplanina en vesículas mediante PCR	43
12. Análisis proteómico	44
12.1 Preparación de las muestras	44
12.2 Nociones básicas sobre espectrometría de masas	45
12.3 Bases de datos e identificación de las proteínas	47
12.4 Validación estadística de los resultados en las bases de datos	47
13. Ensayo de migración e invasión <i>in vitro</i>	47
14. Ensayo de angiogénesis y linfangiogénesis <i>in vitro</i>	48
15. Ensayo de tumorigenicidad en ratones atímicos	48
16. Ensayo de cicatrización de heridas <i>in vivo</i>	49
17. Análisis estadísticos	49
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>PARTE I. CARACTERIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE PODOPLANINA EN VESÍCULAS EXTRACELULARES</b>	<b>53</b>
1. Resultados preliminares	53
2. Podoplanina es secretada al medio asociada a vesículas extracelulares	54
2.1 Las vesículas extracelulares contienen el mRNA de podoplanina	55
3. Podoplanina es internalizada y se localiza en endosomas tempranos y en cuerpos multivesiculares	56
4. Podoplanina se localiza en la membrana de vesículas extracelulares	58
5. Podoplanina se incorpora tanto a exosomas como a microvesículas	60



6. Podoplanina regula la producción de microvesículas y exosomas	62
6.1 El silenciamiento de la expresión de podoplanina en células de carcinoma reduce su tumorigenicidad	64
6.2 Podoplanina es secretada <i>in vivo</i> asociada a exosomas	65
<b>PARTE II. ESTUDIOS PROTEÓMICOS DEL CONTENIDO DE EXOSOMAS</b>	<b>67</b>
1. Análisis proteómico de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN	67
2. Análisis proteómico de exosomas aislados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN	68
<b>PARTE III. RELEVANCIA BIOLÓGICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES QUE CONTIENEN PODOPLANINA</b>	<b>75</b>
1. Captación de exosomas por células MDCK	75
2. Efecto de exosomas-podoplanina en la migración/invasión de las células MDCK	75
3. Efecto de exosomas-podoplanina en la angiogénesis y linfangiogénesis <i>in vitro</i>	77
4. Efecto de los exosomas en la cicatrización de heridas <i>in vitro</i>	82
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
1. Podoplanina es un componente de vesículas extracelulares	85
2. Podoplanina promueve una transición epitelio-mesénquima asociada con la progresión maligna	86
3. Podoplanina induce una reprogramación del contenido proteico de exosomas	88
4. Una nueva función para podoplanina como un modulador de la biogénesis de vesículas extracelulares	90
5. Hacia una función biológica de exosomas-podoplanina como moduladores de la linfangiogénesis	91
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>115</b>



## **ABREVIATURAS**



**ABs:** Cuerpos apoptóticos (“Apoptotic Bodies”).

**ACN:** Solución de bicarbonato amónico/acetonitrilo.

**ANXA6:** Anexina-A6 (“Annexin A6”).

**ARF:** Factor de ribosilación de ADP (“ADP Ribosylation Factor”).

**BSA:** Albúmina sérica bovina (“Bovine Serum Albumin”).

**CAFs:** Fibroblastos “activados” asociados con el cáncer (“Cancer Associated Fibroblasts”).

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario a la hebra de ARN.

**c-EXOs:** Fracción cruda de exosomas (“crude EXOsomes”).

**CID:** Cámara de colisión (“Collision-Induced Dissociation”).

**CLEC:** Receptor tipo lectina C (“C-type LECtin-like receptor”).

**CM:** Medio condicionado (“Conditioned Medium”).

**CT:** Citoplasmático.

**DAPI:** 4',6-dianilino-2-fenilindol.

**DLS:** Dispersión dinámica de la luz (“Dynamic Light Scattering”).

**DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**dNTPs:** Deoxirribonucleótidos trifosfatados.

**EC:** Extracelular.

**ECM:** Matriz extracelular (“ExtraCellular Matrix”).

**EDTA:** Ácido etildiaminotetraacético.

**EMT:** Transición epitelio mesénquima (“Epithelial-Mesenchymal Transition”).

**EPS8:** Factor de crecimiento epidérmico sustrato receptor quinasa 8 (“EPidermal growth factor kinase Substrate 8”).

**ERM:** Ezrina, radixina, moesina.

**ESCRT:** Complejo de distribución endosomal requerido para el transporte (“The Endosomal Sorting Complexes Required for Transport”).

**EVs:** Vesículas extracelulares (“Extracellular Vesicles”).

**EXOs:** Exosomas.

**FA:** Ácido fórmico.

**FAK:** Quinasa de adhesión focal (“Focal Adhesion Kinase”).

**FBS:** Suero fetal bovino (“Fetal Bovine Serum”).

**FRCs:** Células reticulares fibroblásticas (“Fibroblastic Reticular Cells”).

**GFP:** Proteína fluorescente verde (“Green Fluorescent Protein”).

**GLPs:** Glicerolfosfolípidos.

**GLS:** Glutaminasa.

**GNAs:** Proteína de unión a nucleótido de guanina, polipéptido actividad estimulante alfa ("Guanine Nucleotide binding protein, Alpha stimulating").

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol.

**HA:** Ácido hialurónico.

**HBSS:** Medio de base Eagle ("BME") con disolución salina equilibrado de HANK'S ("Hank's Balanced Salt Solution").

**HLECs:** Células endoteliales linfáticas humanas ("Human Lymphatic Endothelial Cells").

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución ("High-Performance Liquid Chromatography").

**HUVEC:** Cultivo primario de células endoteliales microvasculares humano ("Human Microvasculature Endothelial Cell line").

**IF:** Inmunofluorescencia.

**ILVs:** Vesículas intraluminales ("IntraLuminal Vesicles").

**IP:** Inmunoprecipitación.

**ISG15:** Gen estimulado por interferón-15 ("Interferon-Stimulated Gene, ISG").

**kDa:** Kilodalton.

**LAMP:** Proteínas de membrana asociadas con lisosomas ("Lysosome-Associated Membrane glycoprotein").

**M/Z:** Masa/carga.

**MDCK:** Células epiteliales de riñón de perro ("Madin-Darby Canine Kidney cells").

**ME:** Microscopio electrónico.

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad ("Major Histocompatibility Complex").

**miRNA:** MicroRNA.

**mRNA:** RNA mensajero.

**MS:** Espectrómetro de masas ("Mass Spectrometry").

**MS/MS:** Espectrómetro de masas en tándem.

**MVBs:** Cuerpos multivesiculares ("MultiVesicular Bodies").

**MVs:** Microvesículas.

**pb:** Pares de bases.

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PDPN:** Podoplanina.

**PFA:** Paraformaldehído.

**PKA:** Proteína kinasa A.

**PKC:** Proteína kinasa C.

**PLAG:** Dominio de agregación plaquetaria ("Platelet-aggregation stimulating domain").

**PLOD2:** Procolágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa-2 ("Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2").

**PM:** Membrana plasmática ("Plasma Membrane").

**PTPN1:** Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 1 ("Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 1").

**RE:** Retículo Endoplásmico.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**ROCK:** Quinasa de Rho.

**Rsc:** Ratio de cuentas espectrales ("Spectral count ratio").

**SCC:** Carcinoma escamoso ("Squamous Cell Carcinoma").

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

**SERPINE1/PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno-1 ("Plasminogen Activator Inhibitor Type 1").

**SK-MEL-28:** Células de melanoma humano ("Melanoma cell line").

**SNARE:** Receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida ("Soluble NSF Attachment protein REceptor").

**TBS:** Tampón tris salino.

**TEM:** Dominios enriquecidos en tetraspaninas ("Tetraspanin-Enriched Microdomains").

**TES:** Testina ("Testin").

**TFA:** Ácido trifluoroacético.

**TfR:** Receptor de transferrina ("Transferrin receptor").

**TM:** Transmembrana.

**TPA:** 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial ("Vascular Endothelial Growth Factor").

**WB:** Western-blot.

**WCL:** Lisado celular ("Whole cell lysate").





# INTRODUCCIÓN

---



## 1. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES, UN NUEVO MECANISMO DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR

La comunicación intercelular es la capacidad que tienen todas las células de intercambiar información físico-química con el medio ambiente y con otras células. Por tanto, la comunicación intercelular es fundamental para la supervivencia y el mantenimiento de la homeostasis en todos los sistemas multicelulares. Hasta hace poco se pensaba que la comunicación intercelular se establecía a través de dos mecanismos generales; por un lado, mediante proteínas solubles (factores de crecimiento, hormonas...) secretadas por distintos tipos celulares que interaccionan con receptores de las células diana y provocan una respuesta celular; y por otro, a través de la comunicación directa célula-célula o célula-matriz extracelular ("ExtraCellular Matrix", ECM), como es el caso de las uniones tipo Gap, que permiten el transporte de iones y pequeñas moléculas, o integrinas y cadherinas que transmiten señales físico-químicas a través de su interacción con el citoesqueleto y mediante moléculas señalizadoras presentes en las estructuras adhesivas, tales como  $\beta$ -catenina, Src y FAK (Focal Adhesion Kinase). Estas uniones celulares sirven, además, para proporcionar solidez y continuidad al tejido u órgano (Mitra et al. 2005; Raposo and Stoorvogel 2013).

Estudios recientes han descrito un tercer mecanismo de comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares ("Extracellular Vesicles", EVs), que actúan como vehículos para la transferencia de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos entre distintas células (Thery et al. 2009). Las EVs son vesículas recubiertas por una bicapa lipídica secretadas por diferentes tipos celulares al medio extracelular. Las EVs, dependiendo de su origen y tamaño, se han clasificado en: **exosomas** (EXOs), **microvesículas** (MVs) o ectosomas y **cuerpos apoptóticos** ("Apoptotic Bodies", ABs) (El Andaloussi et al. 2013).

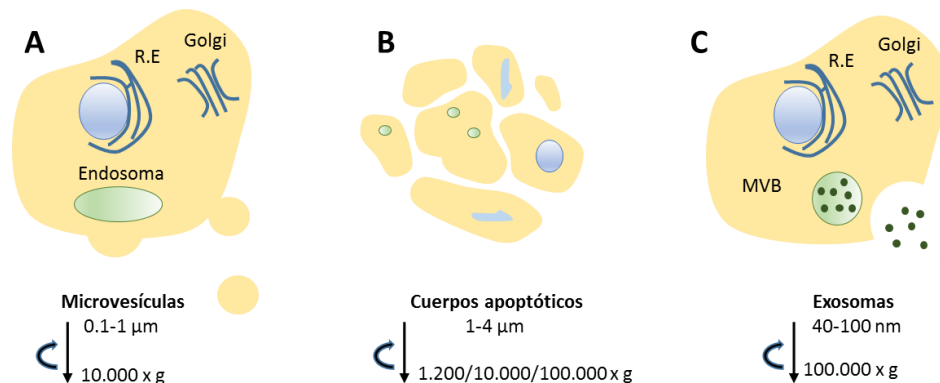
### 1.1 Exosomas y Microvesículas

Los EXOs son vesículas de membrana que se originan a partir de compartimentos endosomales internos llamados cuerpos multivesiculares ("MultiVesicular Bodies", MVBs). Se caracterizan por tener un diámetro entre 40-100 nm y una densidad de flotación que oscila entre 1,13 g/ml y 1,19 g/ml. Estas vesículas se obtienen por ultracentrifugación diferencial del medio de cultivo (100.000 x g; fracción cruda de EXOs (c-EXOs)) seguida de una centrifugación en gradiente de densidad.

Las MVs se originan por gemación de la membrana plasmática y son liberadas directamente al medio extracelular. Las MVs son bastante heterogénea respecto a los EXOs, con tamaños que varían desde 100 nm hasta más de 1  $\mu\text{m}$ , y sedimentan a una velocidad menor ( $10.000 \times g$ ). Ambos tipos de EVs están enriquecidos en marcadores específicos tales como CD63, TSG101, CD81 y CD9 (Raposo and Stoorvogel 2013). Tanto las MVs como los EXOs se han aislado de distintas líneas celulares y se han detectado en fluidos corporales, lo que sugiere un papel fisiológico para ambos tipos de vesículas (Raposo and Stoorvogel 2013; Simons and Raposo 2009; Thery et al. 2009).

Los ABs, por otro lado, son vesículas secretadas por células que entran en apoptosis y tienen diámetros mayores que las MVs (**Figura 1**). Este tipo de vesículas no se ha estudiado en esta Tesis.

Originalmente los EXOs se identificaron en reticulocitos y se pensó que la función principal de este tipo de EVs era la eliminación de moléculas de superficie durante el proceso de maduración de estas células a eritrocitos (Harding et al. 1984; Pan et al. 1985). Trabajos posteriores renovaron el interés en el estudio de los EXOs debido a su implicación como mediadores de la comunicación intercelular en el sistema inmune (Kleijmeer et al. 1996; Zitvogel et al. 1998), y, más adelante, por su implicación en el cáncer (Azmi et al. 2013; Harding et al. 2013).



**Figura 1. Los diferentes tipos de vesículas extracelulares tienen tamaños y orígenes distintos.** (A) las MVs se originan por gemación de la membrana plasmática y se aíslan tras una centrifugación del medio condicionado a  $10.000 \times g$  durante 30 min. (B) La muerte celular programada o apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares generando un número variable de vesículas de diferentes tamaños que sedimentan entre los  $1.200$  a  $100.000 \times g$ . (C) Los EXOs son liberados al medio extracelular por la fusión de los MVBs con la membrana plasmática y se pueden aislar tras una ultracentrifugación a  $100.000 \times g$  durante 1 h.

## 1.2 Composición molecular de los exosomas

La composición molecular de los EXOs varía dependiendo del tipo celular, del origen y del estado fisiológico de la célula emisora. No obstante, los diversos análisis proteómicos, lipidómicos y transcriptómicos realizados sobre estas vesículas muestran ciertos rasgos bioquímicos comunes entre ellas, independientemente de la célula de donde provienen (**Figura 2**) ([Chaput and Thery 2011](#); [Raposo and Stoorvogel 2013](#); [Stoorvogel et al. 2002](#)). Debido a su origen endosómico, en la superficie de los EXOs se han identificado componentes del complejo de distribución endosomal requerido para el transporte ("Endosomal Sorting Complex Required for Transport", ESCRT), tales como TSG101; proteínas asociadas a este complejo (Alix y Clatrina); tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), que constituyen una de las familias proteicas más abundantemente representadas en los EXOs y se emplean como marcadores de estas vesículas; integrinas; y componentes de balsas lipídicas como flotilinas y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (CD55 y CD59). En el lumen de los EXOs se han identificado, además, componentes del citoesqueleto (actina y tubulina), proteínas implicadas en el transporte vesicular y fusión de los MVBs con la membrana plasmática, tales como anexinas, RAB GTPasas y SNARE ("Soluble NSF Attachment protein REceptor"), y proteínas de respuesta a estrés o chaperonas (HSP60, HSP70 y HSP90) ([Colombo et al. 2014](#); [Mathivanan et al. 2010](#); [Mears et al. 2004](#); [Raposo and Stoorvogel 2013](#); [Record et al. 2011](#); [Wubbolts et al. 2003](#)). Por otro lado, se han identificado proteínas específicas que dependen únicamente del tipo celular del que provienen; por ejemplo, la proteína A33 que es secretada por células epiteliales de colon y se utiliza como un marcador específico en pacientes con este tipo de cáncer ([van Niel et al. 2001](#)), y proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad ("Major Histocompatibility Complex", MHC-I y II) en EXOs aislados de células presentadoras de antígeno ([Raposo et al. 1996](#)).

Aunque menos estudiados, los lípidos también juegan un papel importante en la biogénesis de estas vesículas. Los EXOs están enriquecidos en esfingomielina, colesterol, fosfatidilserina, ceramidas y el gangliósido GM3 (**Figura 2**) ([Laulagnier et al. 2004](#); [Laulagnier et al. 2005](#); [Llorente et al. 2013](#); [Trajkovic et al. 2008](#); [Wubbolts et al. 2003](#)). La esfingomielina y el colesterol son los componentes principales de las balsas lipídicas. Estas constituyen microdominios específicos de la membrana plasmática que actúan como plataformas de señalización y juegan un papel clave en los procesos de endocitosis, transducción de señales, adhesión celular y entrada de patógenos. Esta observación es compatible con la presencia en EVs de flotilinas, proteínas asociadas a balsas lipídicas, como CD44 y proteínas ancladas a GPI. Las balsas lipídicas han sido

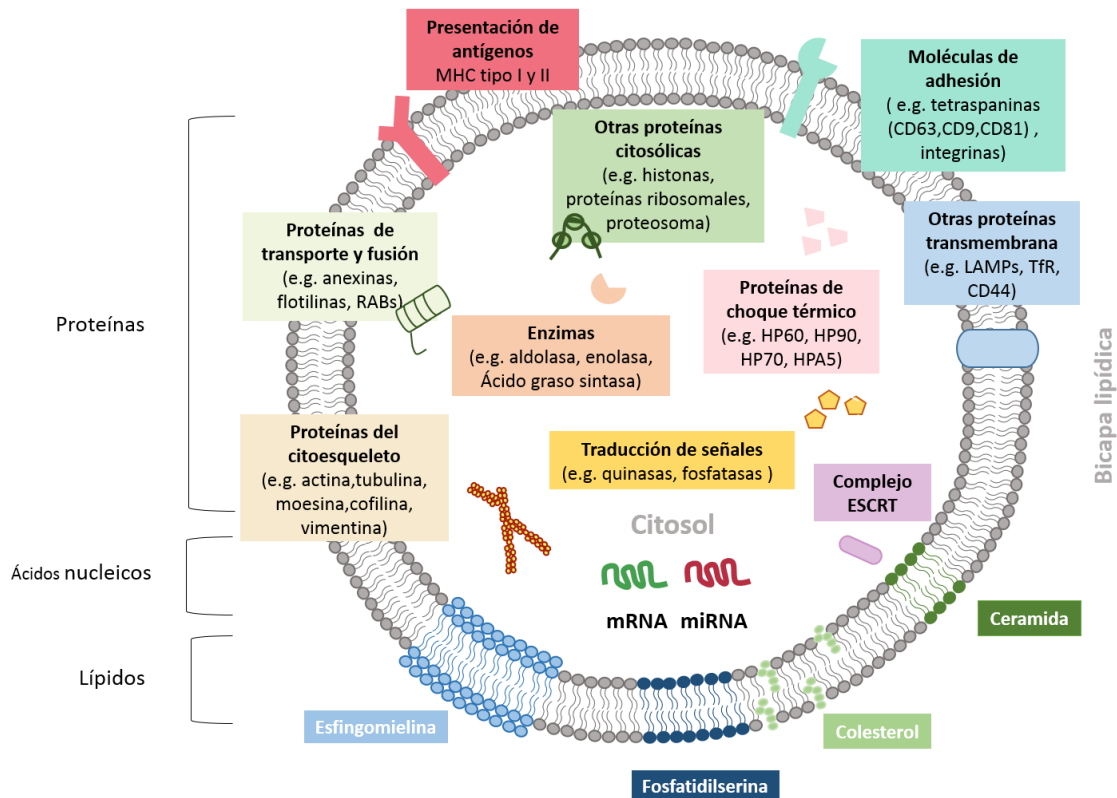
implicadas en la selección de proteínas que se incorporan a EXOs (de Gassart et al. 2003; Ikonen 2001; Tan et al. 2013). Un ejemplo de ello es la anexina A2 que se secreta en EXOs debido a que se transloca a la membrana plasmática asociándose con colesterol y fosfatidilinositol (Valapala and Vishwanatha 2011).

Una observación importante es que los EXOs transportan moléculas de RNA mensajero (mRNA) y de micro RNA (miRNA) (**Figura 2**). Las moléculas de mRNA pueden traducirse a proteínas en células diana que han incorporado estas vesículas, lo que constituye un nuevo mecanismo de intercambio genético entre las células (Valadi et al. 2007). Asimismo, estudios recientes han demostrado que los miRNAs pueden transferirse a células receptoras y ser capaces de reprimir la expresión de sus genes diana (Ismail et al. 2013; Montecalvo et al. 2012; Pegtel et al. 2010). Al igual que ocurre con las proteínas y los lípidos, el contenido de RNAs viene determinado por la célula de origen. Otros estudios han mostrado que EXOs derivados de células tumorales contienen DNA de doble cadena que podrían ser utilizados en la clínica como biomarcadores circulantes para identificar las mutaciones presentes en el tumor de origen (Thakur et al. 2014). Los resultados de todos estos estudios se recogen en bases de datos: Exocarta (Mathivanan et al. 2012), Vesiclepedia (Kalra et al. 2012) y Evpedia (Kim et al. 2013), que se actualizan continuamente para facilitar la comprensión de la complejidad de las EVs.

### 1.3 Biogénesis de los exosomas

#### 1.3.1 Formación de vesículas intraluminales

Los EXOs se forman a través de la ruta endocítica, mediante invaginaciones de la membrana plasmática que dan lugar a endosomas tempranos, los cuales maduran a endosomas tardíos y forman los MVBs, en cuyo interior se acumula gran cantidad de vesículas intraluminales (“IntraLuminal Vesicles”, ILVs), las cuales se originan, a su vez, por invaginaciones de la membrana de los MVBs. Una vez formados, los MVBs pueden “degradarse” fusionándose con lisosomas o sufrir “exocitosis”, lo que implica la fusión de los MVBs con la membrana plasmática y la liberación de los ILVs (o EXOs) al medio extracelular (Simons and Raposo 2009) (**Figura 3**). La maquinaria molecular implicada en la biogénesis de los MVBs no se conoce con exactitud, aunque se han identificado varias moléculas que parecen estar implicadas en este proceso, como los componentes del complejo ESCRT, algunos lípidos y tetraspaninas (Colombo et al. 2014).



**Figura 2. Representación esquemática de la composición molecular de un exosoma.** Las proteínas se han clasificado según su función: ARF, factor de ribosilación de ADP; ESCRT, complejo de distribución endosomal requerido para el transporte; LAMP, proteína de membrana asociada con lisosomas; TfR, receptor de transferrina. Esquema adaptado de (Colombo et al. 2014).

### 1.3.2 Mecanismos de la biogénesis de exosomas dependientes e independientes del complejo ESCRT

El complejo ESCRT se encuentra muy conservado y se compone de ~ 30 proteínas que se organizan en cuatro complejos multiproteicos: ESCRT-0, I, II y III, así como de proteínas asociadas: Alix y la ATPasa VPS4 de la familia AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities). El primer paso de la ruta endocítica es la ubiquitinación de proteínas transmembrana, que sirve como señal para el reclutamiento de dichas proteínas a la membrana endosomal. El complejo ESCRT-0 reconoce y recluta las proteínas que van a ser internalizadas, mientras que los complejos ESCRT-I y II dirigen las proteínas ubiquitinadas hacia los MVBs. ESCRT-I y -II parecen ser los responsables de la deformación de la membrana con las proteínas seleccionadas para formar las “yemas” que darán lugar a las ILVs, mientras que el complejo ESCRT-III es el responsable de la escisión de las ILVs. Estos complejos se reclutan de forma transitoria y secuencial desde el citoplasma a los compartimentos endosómicos.

El complejo ESCRT-0 es un heterodímero formado por las subunidades HRS y STAM. A través de la subunidad HRS este complejo se une a la membrana endosomal por su interacción con el fosfolípido PIP3, y mediante los motivos de interacción con ubiquitinas presentes en la subunidad STAM reconoce a la proteína ubiquitinada. Un único complejo ESCRT-0 puede unir hasta cinco proteínas ubiquitinadas distintas o, en su defecto, a una proteína cargo poliubiquitinada, lo que contribuye a la concentración de proteínas en la membrana endosomal. El complejo ESCRT-0 recluta el complejo ESCRT-I a la membrana endosomal por la interacción directa de HRS con TSG101, un componente del complejo ESCRT-1. Este, a su vez, recluta ESCRT-II, que contiene, además, un dominio GLUE que le permite ser reclutado a la membrana del endosoma de forma independiente del complejo ESCRT-I. Por tanto, cada uno de los tres complejos ESCRT (ESCRT-0, -I, y -II) interacciona con las proteínas ubiquitinadas y estabiliza estas proteínas en la membrana de los endosomas. A continuación, el complejo ESCRT-II activa la polimerización del complejo ESCRT-III, que es crucial en la formación de las ILVs, reclutando las moléculas implicadas en la desubiquitinación de las proteínas (DOA4) y en el desensamblaje de los complejos ESCRT (VPS4) ([Hanson and Cashikar 2012](#); [Schmidt and Teis 2012](#)). Se han descrito casos de proteínas no ubiquitinadas que son incorporados a las ILVs, como es el caso de la proteína PMEL en melanosomas ([Theos et al. 2006](#)). Además de proteínas transmembrana se incorporan al lumen de las ILVs proteínas citosólicas. El mecanismo para la incorporación de proteínas solubles no es conocido. Estudios recientes han demostrado que la chaperona HSC70 juega un papel importante en la selección de proteínas contenidas en EXOs por el reconocimiento de una secuencia específica KFERQ presente en la proteína exosomal ([Sahu et al. 2011](#)).

Se ha demostrado que la síntesis de ceramida a partir de la esfingomielina es necesaria para la secreción de EXOs en oligodendrocitos ([Trajkovic et al. 2008](#)). Así mismo, las tetraspaninas se han relacionado también con la formación de estas vesículas. Las tetraspaninas son proteínas integrales de membrana que poseen la capacidad de asociarse con determinados lípidos y otras proteínas transmembrana organizadas en microdominios enriquecidos en tetraspaninas ("Tetraspanin-Enriched Microdomains", TEM). La secreción de EXOs en células HEK293 es dependiente de la expresión de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 ([Chairoungdua et al. 2010](#); [Verweij et al. 2011](#)), y la secreción de proteínas del complejo MHC-II en células presentadoras de antígeno se debe a la incorporación de estas proteínas a dominios de membrana enriquecidos en CD9 ([Buschow et al. 2009](#)).



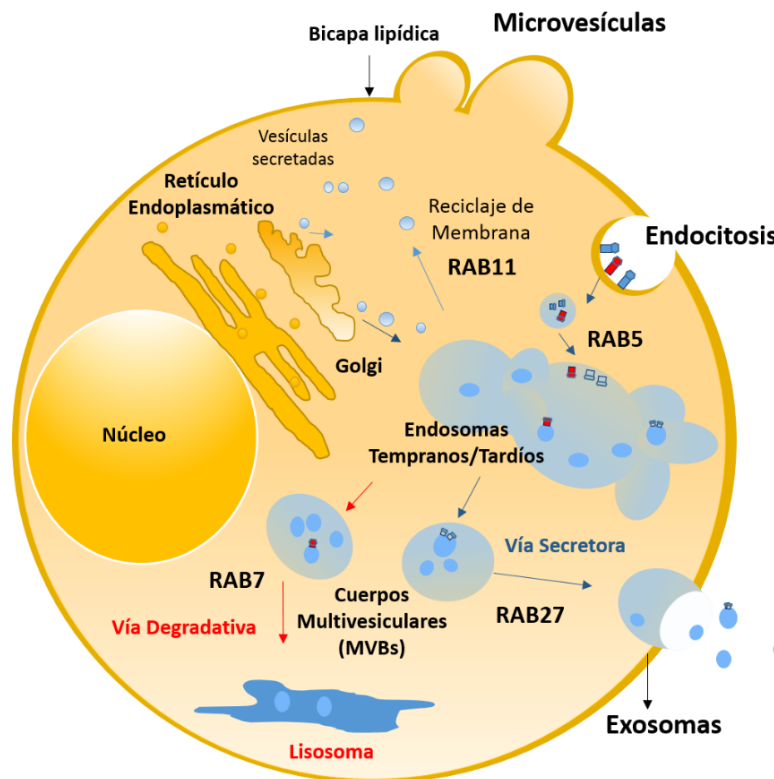
### 1.3.3 Liberación de las vesículas intraluminales

Los MVBs deben fusionarse con la membrana plasmática para liberar el contenido intraluminal. En este proceso está implicada una familia de GTPasas monoméricas, RAB, que regulan el tráfico de vesículas entre diversos compartimentos celulares a lo largo de la vía endocítica y secretora mediante su asociación con proteínas motoras que se mueven a lo largo del citoesqueleto celular (**Figura 3**) (Brett and Traub 2006; Hammer and Wu 2002). Se han descrito diversas proteínas que participan en el proceso: RAB11 está implicada en el reciclaje de endosomas, mientras que a RAB27A se le ha implicado en la secreción de EXOs en células T (Stinchcombe et al. 2001). Por otro lado, RAB7 media la maduración de endosomas tardíos y su fusión con lisosomas, y RAB5 la internalización de vesículas recubiertas de clatrina y su fusión con endosomas tempranos (Stenmark 2009). La fusión de la membrana de los MVBs con la membrana plasmática para liberar las ILVs/EXOs parece estar mediada por receptores SNARE. Las proteínas SNARE se localizan en las membranas destinadas a fusionarse e interactúan entre sí constituyendo complejos que consiguen aproximar ambas membranas y favorecer la exocitosis de las vesículas. En la membrana plasmática, se localiza el complejo t-SNARE, y en la membrana de la vesícula el complejo v-SNARE, y entre ellas se reclutan proteínas RAB que dirigen el proceso de fusión. Estos complejos opuestos interactúan entre sí facilitando el contacto de las membranas y la fusión de las mismas. Por último, las proteínas NSF ("N-ethylmaleimide-Sensitive Factor") se requieren para la disociación de los complejos SNARE liberando sus proteínas para su reutilización en rondas posteriores de fusión de membrana (Bonifacino and Glick 2004; Jahn and Scheller 2006; Zylbersztejn and Galli 2011).

### 1.4 Biogénesis de microvesículas

En realidad se conoce muy poco acerca del mecanismo de formación de las MVs, aunque cada vez es mayor el número de publicaciones que abordan esta cuestión. El inicio del proceso es la deformación de la membrana plasmática como consecuencia de la agregación de proteínas de secreción o modificaciones en la propia composición de lípidos. Este efecto en la curvatura de la membrana va a dar lugar a la gemación o protuberancia de la vesícula y al reclutamiento de proteínas implicadas en la escisión y liberación de las MVs al medio extracelular (Muralidharan-Chari et al. 2010). El proceso de escisión se asemeja a los mecanismos de liberación de los viriones o, también, al proceso de citocinesis o separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular. La función del citoesqueleto parece ser clave en la liberación de estas vesículas; por ejemplo, la quinasa que fosforila a la cadena ligera de la miosina II (MLCK)

induce la contracción del citoesqueleto de actina y se localiza en la zona de cierre de mde la actomiosina por la GTPasa ARF6 es necesaria para la liberación de las MVs por células de melanoma (Muralidharan-Chari et al. 2009).

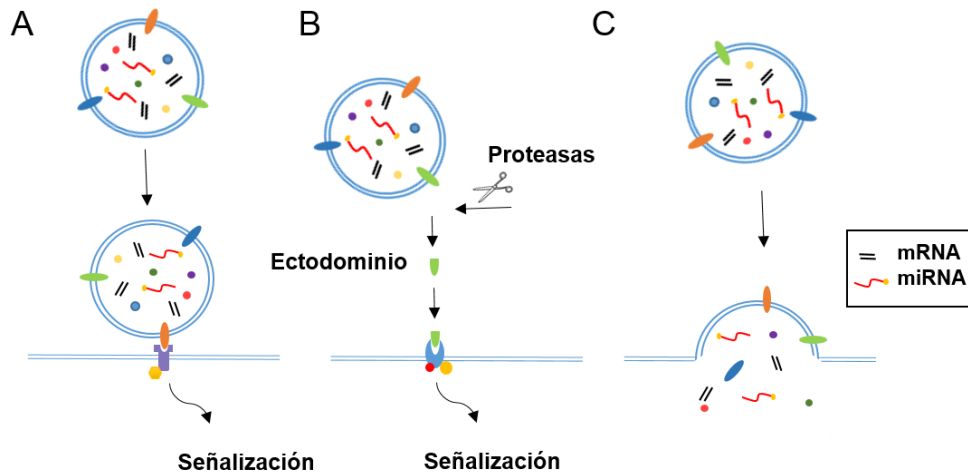


**Figura 3. Esquema de la biogénesis de exosomas y microvesículas.** Los MVBs se forman mediante invaginaciones de la membrana plasmática que dan lugar, primero, a endosomas tempranos, los cuales durante su maduración a endosomas tardíos acumulan ILVs en sus lúmenes. Los MVBs pueden fusionarse con lisosomas y ser degradados o fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al medio extracelular. Las ILVs secretadas se conocen como EXOs. Las vesículas que se forman desde el aparato de Golgi pueden ir bien a la membrana para su reciclaje o fusionarse con endosomas. Las vesículas secretadas directamente por gemación de la membrana plasmática se conocen como MVs. Las RAB GTPasas están implicadas en la regulación del tráfico vesicular.

## 1.5 Funciones de vesículas extracelulares

En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de las EVs debido a su implicación en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Hoy en día se les atribuye un papel en la respuesta inmune, coagulación, procesos inflamatorios y el cáncer. (Benito-Martin et al. 2015; Mittelbrunn et al. 2011). Se han postulado distintos mecanismos a través de los cuales las EVs median la comunicación entre células; por un lado, ligandos presentes en la membrana de estas vesículas pueden interaccionar y activar receptores de células dianas, o receptores transportados por EVs unir ligandos celulares. A su vez, ligandos solubles tras la escisión por proteasas de los ectodominios

de proteínas transmembranas de EVs, pueden activar receptores de las células diana. Además, estas vesículas pueden fusionarse con la membrana plasmática de la célula diana, o internalizarse por endocitosis, y transferir su contenido al interior celular (**Figura 4**) (Mathivanan et al. 2010; Morelli et al. 2004).



**Figura 4. Mecanismos potenciales de señalización mediada por las vesículas extracelulares.** (A) proteínas de membrana de las vesículas pueden interactuar con receptores de la célula diana activando rutas de señalización. (B) Proteínas de membrana de las vesículas pueden actuar como ligandos solubles por escisión de sus ectodominios por proteasas y activar vías de señalización en células receptoras y (C) las vesículas pueden fusionarse con la membrana de la célula diana y liberar su contenido al interior; a su vez, la membrana de la célula diana puede modificarse al incorporar los receptores de membrana transportados por las vesículas, activando múltiples cascadas de señalización. Adaptado de (Mathivanan et al. 2010).

### 1.5.1 Función en el cáncer

En condiciones fisiológicas las células normales secretan EVs al medio extracelular. Sin embargo, se ha demostrado una mayor secreción de estas vesículas por parte de las células tumorales. Las EVs son capaces de alterar la homeostasis del microambiente tumoral (Castellana et al. 2009). Existen muchos mecanismos por los cuales las EVs secretadas por las células tumorales afectan al desarrollo tumoral:

- Las EVs pueden servir como vehículos para la transmisión de información genética que incluye mRNAs, miRNAs o DNA. Se han detectado diversos oncogenes secretados por células tumorales, como el receptor EGFRvIII por glioblastomas (Skog et al. 2008), c-MET por células de melanoma (Peinado et al. 2012) o Kras por células tumorales de colon (Demory Beckler et al. 2013), que son transferidos a células diana y son funcionales en esta nueva ubicación.

- Las EVs pueden remodelar la ECM ya que transportan gran cantidad de metaloproteasas, como MT1-MMP, MMP9 o MMP2 ([Dolo et al. 1998](#); [Tauro et al. 2013](#)).
- Las EVs estimulan el proceso de angiogénesis y remodelado vascular debido a su contenido en factores pro-angiogénicos, como la interleucina IL-6 y el VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor") ([Al-Nedawi et al. 2009](#); [Skog et al. 2008](#)). La formación de nuevos vasos facilita la infiltración de las células tumorales en el torrente sanguíneo y su diseminación para promover la metástasis.
- Las EVs son capaces de modificar funcionalmente las células del estroma, convirtiendo a los fibroblastos normales en fibroblastos "activados", asociados con el cáncer ("Cancer Associated Fibroblasts", CAFs). Un ejemplo de ello, es el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1 asociado a EXOs capaz de estimular la diferenciación de fibroblastos normales a un fenotipo de miofibroblasto *in vitro*. Estos miofibroblastos se asemejan a las células del estroma aisladas del tejido tumoral y son capaces de favorecer la angiogénesis y acelerar el crecimiento tumoral ([Webber et al. 2015](#)).
- Las EVs desempeñan un papel en la regulación de la respuesta inmune. Las células tumorales secretan EVs que transportan moléculas inmunosupresoras que inactivan células T y NK ("Natural Killer") y promueven la diferenciación de linfocitos T reguladores o células mieloide para suprimir la respuesta inmune ([Zhang and Grizzle 2011](#)). Un ejemplo de ello es la expresión en la superficie de EVs del ligando de FAS que induce apoptosis en células T activadas ([Andreola et al. 2002](#)).
- Los EXOs derivados de células de melanoma "educan" a los progenitores de la médula ósea para ser reclutados a los nichos pre-metastásicos y favorecer la formación de focos metastásicos alejados del tumor primario ([Peinado et al. 2012](#)).
- Recientemente, se ha descrito la asociación de EVs con la resistencia a fármacos. Por ejemplo, células tumorales de mama resistentes al agente docetaxel transfieren esta resistencia a células tumorales sensibles mediante la secreción de EXOs que transporta la glicoproteína P ([Lv et al. 2014](#)).

Debido a la implicación de las EVs en la progresión tumoral se podrían utilizar como biomarcadores en el cáncer.

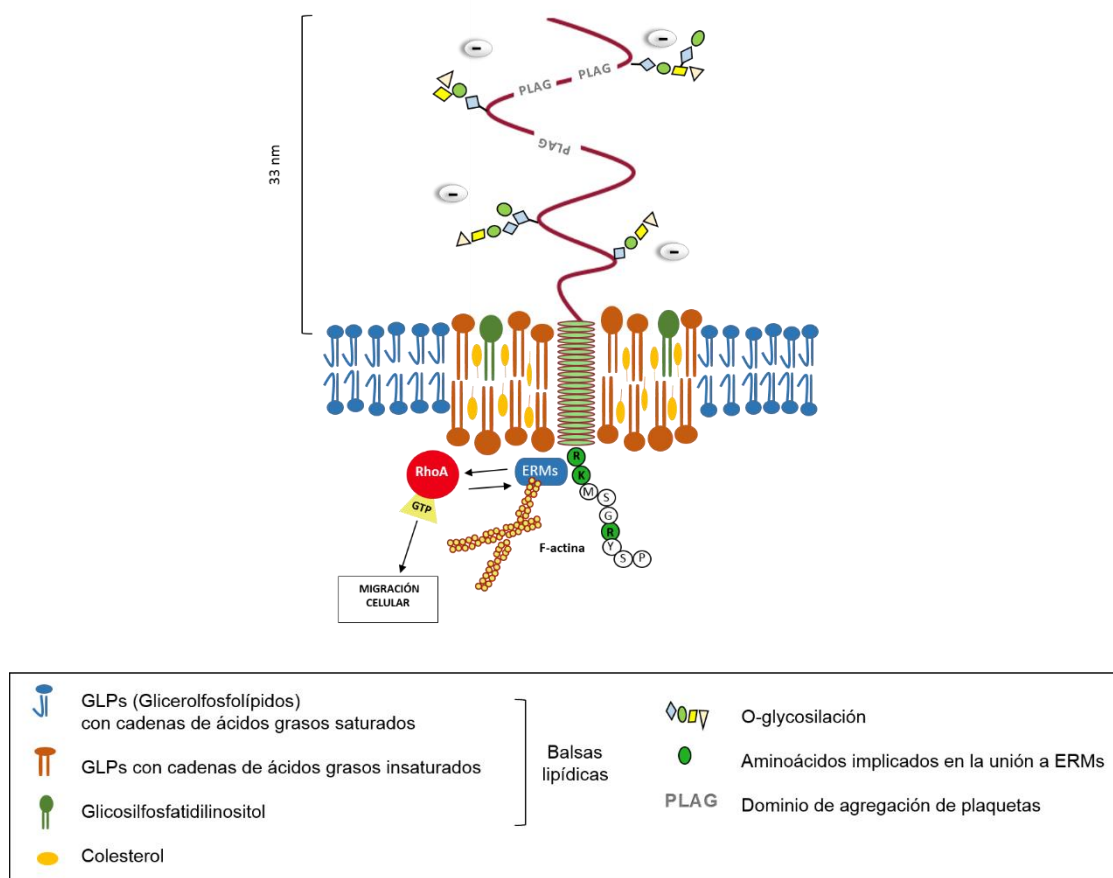
## 2. PODOPLANINA

### 2.1 Estructura

Podoplanina (PDPN) es una pequeña glicoproteína transmembrana tipo I (162 aa la proteína humana y 172 aa la proteína de ratón) que consta de un dominio extracelular (EC) rico en serinas y treoninas O-glicosiladas, un dominio transmembrana (TM) y una región citoplasmática (CT) de tan sólo 9 aa ([Scholl et al. 1999](#)) (**Figura 5**). PDPN se clasifica como una glicoproteína tipo mucina, ya que contiene residuos de ácido siálico anclados en  $\alpha$  (2-3) a galactosa  $\beta$  (1-3) N-acetilgalactosamina ([Kaneko et al. 2007](#); [Scholl et al. 1999](#); [Zimmer et al. 1997](#)). Recientemente, se han identificado 12 sitios de O-glicosilación en la proteína aislada de la línea celular LN229, derivada de un glioblastoma ([Kato and Kaneko 2014](#)). A través del dominio CT interacciona con ezrina y moesina, proteínas de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina) que actúan como conectores del citoesqueleto y la membrana plasmática y regulan la motilidad celular ([Arpin et al. 2011](#)). Además, en su dominio CT, contiene dos residuos de serina (ser-157 y ser-161) altamente conservados que son sitios potenciales de fosforilación. En particular, la ser-157 es previsible que pueda ser fosforilada por PKA y/o PKC y, en la proteína de ratón, se ha observado su fosforilación por PKA *in vitro* ([Krishnan et al. 2013](#)). El dominio TM contiene un motivo altamente conservado GXXXG que está involucrado en la homodimerización de proteínas transmembranas ([Russ and Engelman 2000](#)). Nuestro laboratorio ha demostrado que este motivo es necesario para la homodimerización de PDPN y su localización en balsas lipídicas (**Figura 5**) ([Fernandez-Munoz et al. 2011](#)).

PDPN ha sido identificada en diferentes contextos biológicos por varios grupos de investigación y, por este motivo, ha sido bautizada con distintos nombres. Se describió por primera vez como OTS-8, una proteína inducida en osteoblastos de ratón por el éster del forbol TPA ([Nose et al. 1990](#)), y como gp38, haciendo referencia a una glicoproteína aislada de tejidos linfoides periféricos homóloga a OTS-8 ([Farr et al. 1992](#)). En rata, se identificó como T1 $\alpha$  a un marcador de células alveolares tipo I, también por su homología con OTS-8 ([Rishi et al. 1995](#)), como E11 a un marcador de osteoblastos y osteocitos ([Wetterwald et al. 1996](#)), y como Aggrus, un factor de agregación de plaquetas ([Kato et al. 2003](#)). Más tarde se describió como gp40 a una sialoglicoproteína de la superficie de células epiteliales de riñón de perro tipo I ("Madin Darby Canine Kidney cells", MDCK), ausente en células MDCK tipo II ([Zimmer et al. 1995](#); [Zimmer et al. 1997](#)), que actúa como receptor para el virus de la influenza C. En nuestro laboratorio, se identificó como antígeno PA2.26 a una glicoproteína homóloga a OTS-8 y gp38 cuya

expresión se induce durante la carcinogénesis química en piel de ratón y durante la cicatrización de heridas (Gandarillas et al. 1997; Scholl et al. 1999). Más tarde, nuestro laboratorio clonó el cDNA e identificó la proteína ortóloga humana (Martin-Villar et al. 2005). La primera referencia de esta proteína como podoplanina tuvo lugar en estudios de nefrosis experimental en ratas, en los que se observó una reducción de su expresión en la membrana de células epiteliales del glomérulo renal, también llamadas podocitos, inducida por la inyección de puromicina (Breiteneder-Geleff et al. 1999). Finalmente, este es el nombre que ha prevalecido en la literatura científica.



**Figura 5. Esquema representativo de la estructura de podoplanina.** PDPN es una glicoproteína tipo mucina con un dominio EC O-glicosilado que contiene los motivos PLAG de unión a la proteína CLEC-2, un dominio TM hidrofóbico y un dominio CT de sólo 9 aa. El dominio CT contiene dos serinas que son sitios potenciales de fosforilación por distintas quinasas. PDPN se une a ezrina/moesina a través de un grupo de aa básicos (verde) del dominio CT y, mediante su asociación con estas proteínas, se ancla al citoesqueleto de actina y activa RhoA GTPasa.

## 2.2 Expresión en tejidos normales

PDPN se expresa en una amplia variedad de tejidos procedente de las tres capas germinales primarias, tales como el epitelio alveolar, mesotelio, células neuronales, osteocitos, etc. (**Tabla 1**). De especial relevancia es su expresión en el endotelio linfático y su ausencia del endotelio sanguíneo (Breiteneder-Geleff et al. 1999), una propiedad que ha convertido a PDPN en uno de los principales marcadores de vasos linfáticos, muy utilizado en los estudios de linfangiogénesis tumoral. Nuestro laboratorio detectó la presencia de PDPN en la capa basal de la epidermis y en fibroblastos dérmicos tras un estímulo pro-inflamatorio con TPA o durante la cicatrización de heridas. PDPN no se expresa en la epidermis normal (Gandarillas et al. 1997).

**Tabla 1.** Expresión de PDPN en tejidos normales

TEJIDO/TIPO CELULAR	REFERENCIA
<b>Riñón:</b> podocitos del glomérulo renal.	(Breiteneder-Geleff et al. 1997; Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 1997)
<b>Pulmón:</b> células alveolares de tipo I.	(Rishi et al. 1995; Scholl et al. 1999; Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 1997)
<b>Sistema inmune:</b> células endoteliales linfáticas, células reticulares fibroblásticas y tejido linfoide periférico.	(Breiteneder-Geleff et al. 1999; Farr et al. 1992; Peduto et al. 2009; Scholl et al. 1999)
<b>Placenta</b>	(Martin-Villar et al. 2005; Scholl et al. 1999)
<b>Cerebro:</b> células de los plexos coroideos, neuronas, células epiteliales ciliadas.	(Kotani et al. 2002; Scholl et al. 1999; Song et al. 2014; Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 1997)
<b>Músculo:</b> cardíaco y esquelético.	(Mahtab et al. 2009; Mahtab et al. 2008; Martin-Villar et al. 2005)
<b>Piel:</b> queratinocitos basales de la epidermis, fibroblastos dérmicos (estímulo pro-inflamatorio, cicatrización de heridas).	(Gandarillas et al. 1997) (Honma et al. 2012)
<b>Hueso:</b> Osteoblastos y osteocitos	(Nose et al. 1990; Wetterwald et al. 1996)
<b>Mesotelio</b>	(Ordóñez 2006)
<b>Cartílago:</b> Condrocitos	(Smith and Melrose 2011)
<b>Testículo en desarrollo</b>	(Marks et al. 1999)
<b>Próstata</b>	(Wilhelm et al. 2014)
<b>Óvarios</b>	(Wilhelm et al. 2014)

## 2.3 Expresión en tumores

La expresión de PDPN aumenta en una amplia variedad de tumores (**Tabla 2**). Mientras que en muchos de ellos el valor pronóstico de la presencia de PDPN no está bien definido, en carcinomas escamosos orales y de piel, así como en glioblastomas, PDPN es un factor de mal pronóstico asociado con un fenotipo agresivo y metastásico (Astarita et al. 2012; Renart et al. 2015).



**Tabla 2.** Expresión de PDPN en tumores

TUMOR	REFERENCIA
<b>Carcinoma escamoso (SCC):</b> cavidad oral, laringe, cérvix, esófago y piel.	(Cueni et al. 2010; Dumoff et al. 2006; Kato et al. 2005; Martin-Villar et al. 2005; Schacht et al. 2005; Wicki et al. 2006; Yuan et al. 2006)
<b>Sistema nervioso central:</b> tumores endocrinos, papilomas de plexos coroideos, meningiomas, astrocitoma pilocítico y glioblastomas.	(Mishima et al. 2006a; Mishima et al. 2006b; Peterziel et al. 2012; Shibahara et al. 2006; Shintaku et al. 2010)
<b>Tumores de células germinales:</b> disgerminomas, tumores de células granulosas, seminomas, carcinomas embrionarios, teratomas, tumores del saco vitelino y tumores testiculares de células germinales.	(Kato et al. 2004; Schacht et al. 2005; Sonne et al. 2006)
<b>Mesotelioma maligno</b>	(Chu et al. 2005; Kimura and Kimura 2005; Ordonez 2006)
<b>Tumores vasculares:</b> angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfagioma, hemangioendotelioma epitelioide.	(Breiteneder-Geleff et al. 1999; Fukunaga 2005; Naqvi et al. 2008)
<b>Carcinoma pleomórfico de pulmón</b>	(Kenmotsu et al. 2008)

## 2.4 Interacción con otras proteínas

PDPN es una glicoproteína que carece de dominios enzimáticos obvios, por lo que debe desempeñar sus funciones a través de su interacción con proteínas de su entorno. Se han identificado varias proteínas que interaccionan con PDPN.

### 2.4.1 CLEC-2

PDPN interacciona con el receptor tipo lectina CLEC-2 ("C-type LECTin-like receptor 2") en la superficie de las plaquetas induciendo la agregación y activación plaquetaria (Kato et al. 2003). La región responsable de esta interacción es un motivo de 8 aa localizado en el dominio EC denominado PLAG, repetido tres veces en tándem, que está muy conservado evolutivamente (**Figura 5**) (Kaneko et al. 2007). La O-glicosilación en la Thr-52 de PLAG3 parece ser indispensable para esta interacción con CLEC-2, la cual tiene una función importante en la metástasis. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la unión de PDPN a CLEC-2 juega un papel clave en la respuesta inmune. Estos hallazgos se detallan más adelante.



### 2.4.2 CD9

Las tetraspaninas son una superfamilia de proteínas integrales de membrana que se caracterizan por tener cuatro dominios TM y desempeñan importantes funciones en diversos procesos biológicos (Hemler 2005; Yanez-Mo et al. 2009). La tetraspanina CD9 actúa como un supresor tumoral interaccionando con PDPN e inhibiendo su capacidad de inducir la agregación plaquetaria y la metástasis en el cáncer de pulmón (Nakazawa et al. 2008). CD9 no interfiere con la unión de PDPN a CLEC-2, lo que sugiere que CD9 afecta a la activación de CLEC-2 independientemente de PDPN, probablemente impidiendo la multimerización de la proteína. Se ha demostrado que CD9 se expresa abundantemente en células endoteliales linfáticas (“Lymphatic Endothelial Cells”, LECs) y es necesaria para la linfangiogénesis (Iwasaki et al. 2013).

### 2.4.3 Galectina-8

Las galectinas son lectinas unidas a  $\beta$ -galactósidos que constituyen una de las familias de proteínas mejor conservadas a través de la evolución. Las galectinas se han relacionado con diversas funciones biológicas, incluyendo la adhesión, migración, quimiotaxis, proliferación, apoptosis y diferenciación celular (Zick et al. 2004). Se ha sugerido que la interacción de PDPN con galectina-8 está involucrada en conectar el endotelio linfático con la ECM (Cueni and Detmar 2009), aunque esto no se ha llegado a demostrar experimentalmente.

### 2.4.4 CD44

CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico (HA), uno de los componentes más importantes de la ECM. CD44 engloba una familia de glicoproteínas transmembrana tipo I generadas mediante un complejo mecanismo de *splicing* alternativo a partir de un único gen. Así, las isoformas variables de CD44 (CD44v) difieren de la isoforma estándar (CD44s) en su dominio EC, que contiene distintas inserciones que confieren a las isoformas CD44v unos patrones de expresión y funciones particulares (Ponta et al. 2003). Por otro lado, modificaciones post-traduccionales, tales como la glicosilación (N-y O-) o la adición de heparán sulfato, constituyen una fuente adicional de variación para todas las isoformas de CD44. En general, a CD44 se la considera una molécula de adhesión y un mediador de la migración celular en una variedad de procesos fisiopatológicos, que incluyen la metástasis tumoral, la cicatrización de heridas y la inflamación. Algunas isoformas de CD44v pueden actuar como co-receptores modulando la transducción de señales a través de receptores tirosina quinasa de la superficie celular (Ponta et al. 2003). Es

importante destacar, asimismo, la identificación de CD44 como un marcador de células troncales en distintos tejidos, tanto normales como tumorales (Zoller 2011).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que PDPN interacciona con CD44s y que dicha interacción es esencial para promover la migración direccional de células de carcinoma escamoso ("Squamous Cell Carcinoma", SCC) (Martin-Villar et al. 2010). Ambas proteínas, PDPN y CD44s, aumentan sus niveles de expresión de manera conjunta durante la progresión maligna en la carcinogénesis química de piel de ratón (Martin-Villar et al. 2010). Por otro lado, se ha sugerido que la interacción PDPN-CD44 podría ser fundamental para el anclaje de células tumorales a ECMs ricas en ácido hialurónico (Tsuneki et al. 2013b). Estudios preliminares de nuestro laboratorio apuntan a que PDPN también interacciona con las isoformas CD44v tanto *in vitro* como *in vivo*, (Montero-Montero et al. resultados no publicados) pero aún se desconoce la relevancia fisiológica de dicha interacción.

### 2.4.5 Ezrina y moesina

PDPN se ancla al citoesqueleto de actina mediante su asociación con las proteínas de la familia ERM ezrina y moesina, que se localizan en proyecciones de la superficie celular como microvilli, filopodios, ruffles y uniones adherentes. Las ERM son conectores que se unen a proteínas de la membrana plasmática a través de su extremo N-terminal o N-ERMAD e interaccionan con el citoesqueleto de actina a través de su extremo C-terminal o C-ERMAD (Fehon et al. 2010; Tsukita and Yonemura 1999). La activación de estas proteínas depende de su estado conformacional. Cuando las proteínas ERM se encuentran inactivas presentan una conformación plegada en el citoplasma, debido a la unión de sus extremos N- y C-terminal. Su activación requiere la unión de PI(4,5) P<sub>2</sub> al extremo N-terminal y la fosforilación en el extremo C-terminal por quinasas, tales como PKC y ROCK, lo que produce la disociación de sus extremos y la adquisición de una conformación abierta, permitiendo la interacción con los ligandos de la membrana plasmática y los filamentos de actina (Tsukita and Yonemura 1999).

### 2.4.6 Otras proteínas (CCL21 y HSPA9)

Las quimiocinas juegan un papel importante en el funcionamiento del sistema inmune, CCL19 y CCL21 interactúan con el receptor CCR7 y son importantes para favorecer la migración de las células durante la respuesta inmune adaptativa. Se ha demostrado que PDPN une con alta afinidad CCL21, favoreciendo la migración dirigida de células CCR7-positivas (Kerjaschki et al. 2004).

La proteína de choque térmico A9 (“Heat Shock Protein A9”, HSPA9) es un miembro de la familia de chaperonas Hsp70 que presenta diferentes localizaciones subcelulares dependiendo del tipo celular. Esta proteína está implicada en múltiples funciones, tales como la respuesta a estrés, el tráfico intracelular, el procesamiento de antígenos y el control de la proliferación y diferenciación celular y se ha implicado en la formación de tumores ([Wadhwa et al. 2002](#)). HSPA9 es secretada al medio extracelular por SCCs de la mucosa oral, interactuando con PDPN en la superficie celular y cooperando eficientemente en la invasión de estas células ([Tsuneki et al. 2013a](#)).

## 2.5 Función biológica de podoplanina

### 2.5.1 Podoplanina en el desarrollo embrionario

A pesar de los numerosos estudios existentes acerca de la función de PDPN en distintos modelos experimentales, su papel fisiológico aún no está bien definido. Los estudios con ratones deficientes en PDPN han revelado que desempeña un papel crucial en el desarrollo del sistema linfático, del pulmón y del corazón ([Astarita et al. 2012](#)). Los ratones mueren al nacer debido a un fallo respiratorio, ya que se bloquea la diferenciación de las células alveolares tipo I y, como consecuencia, se producen alteraciones en la morfología del pulmón ([Schacht et al. 2003](#)). En los ratones *pdpn*<sup>(-/-)</sup> se observan defectos en la organización y funcionalidad del sistema vascular linfático, pero no del sanguíneo. Esto es debido a que la separación correcta de los pre-vasos linfáticos del sistema vascular sanguíneo en desarrollo requiere la activación plaquetaria por PDPN. Otros autores han descrito que los ratones deficientes en PDPN presentan alteraciones en la formación del corazón. En estos ratones se observa una deficiente formación del miocardio, que correlaciona con una transición epitelio-mesénquima (“Epithelial Mesenchymal Transition”, EMT) anormal del epitelio celómico debido a niveles elevados de cadherina E y a una actividad disminuida de RhoA GTPasa, provocada por la ausencia de PDPN ([Mahtab et al. 2009](#); [Mahtab et al. 2008](#)).

### 2.5.2 Función de podoplanina en el sistema inmune

Como hemos comentado anteriormente, PDPN se expresa en la superficie de células endoteliales linfáticas (LECs), donde regula el desarrollo de los vasos linfáticos. Además, PDPN se ha detectado en células reticulares fibroblásticas (“Fibroblastic Reticular Cells”, FRCs) y en células dendríticas foliculares de órganos linfoides. La expresión PDPN en las células endoteliales de los vasos linfáticos promueve la migración de las células dendríticas, que expresan el receptor CLEC-2 en su superficie, desde las zonas periféricas a los ganglios linfáticos, a través de la interacción de PDPN

con el receptor CLEC-2 ([Acton et al. 2012](#)). Las FRCs en los ganglios linfáticos forman una malla reticular, que no sólo sirve como apoyo estructural, sino que proporciona una superficie de adherencia para las células dendríticas, los macrófagos y las células T. La interacción de PDPN, en las FRCs, con el receptor CLEC-2 de la superficie de células dendríticas maduras regula la contractilidad actina-miosina del citoesqueleto de FRCs y esto, a su vez, produce una relajación en la malla reticular que favorece la presentación antigénica ([Acton et al. 2014](#); [Astarita et al. 2015](#)). Recientemente, se ha observado que PDPN regula negativamente a las células T efectoras en las respuestas inflamatorias autoinmunes, como la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal establecido para la esclerosis múltiple.

### 2.5.3 Función de podoplanina en el cáncer

Se han propuesto varios mecanismos independientes para explicar la función de PDPN como promotor de la progresión tumoral. Por un lado, PDPN en la superficie de las células tumorales es capaz de inducir la agregación y activación plaquetaria por su interacción con el receptor CLEC-2 de la superficie de las plaquetas ([Kato et al. 2003](#)). La agregación plaquetaria ha sido descrita como un mecanismo de supervivencia para las células tumorales en el torrente circulatorio, ya que las enmascara y protege del estrés producido por el flujo sanguíneo e impide el reconocimiento de las células tumorales por las células del sistema inmune. Además, la activación de las plaquetas induce la secreción de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), favoreciendo el desarrollo de la metástasis ([Verheul et al. 2000](#); [Verheul et al. 1997](#)). Por otro lado, nuestro laboratorio ha demostrado que PDPN estimula la migración e invasión celular al interaccionar con proteínas ERM. Esta interacción promueve cambios en la morfología celular al inducir una activación de RhoA y RhoC GTPasas, y de su quinasa efectora ROCK, que conduce a una EMT parcial o completa ([Martin-Villar et al. 2006](#); [Martin-Villar et al. 2005](#)). Otros autores han descrito que PDPN promueve la migración e invasión colectiva de las células tumorales en ausencia de EMT ([Wicki et al. 2006](#)). Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito la presencia de PDPN en proyecciones ventrales de la membrana plásmatica ricas en F-actina, llamadas invadopodios. Estas estructuras tienen actividad proteolítica y median la invasión de las células de carcinoma a través de la densa membrana basal que separa los epitelios del tejido conectivo. PDPN favorece la estabilidad de los invadopodios y una degradación eficiente de la ECM ([Martin-Villar et al. 2015](#)).

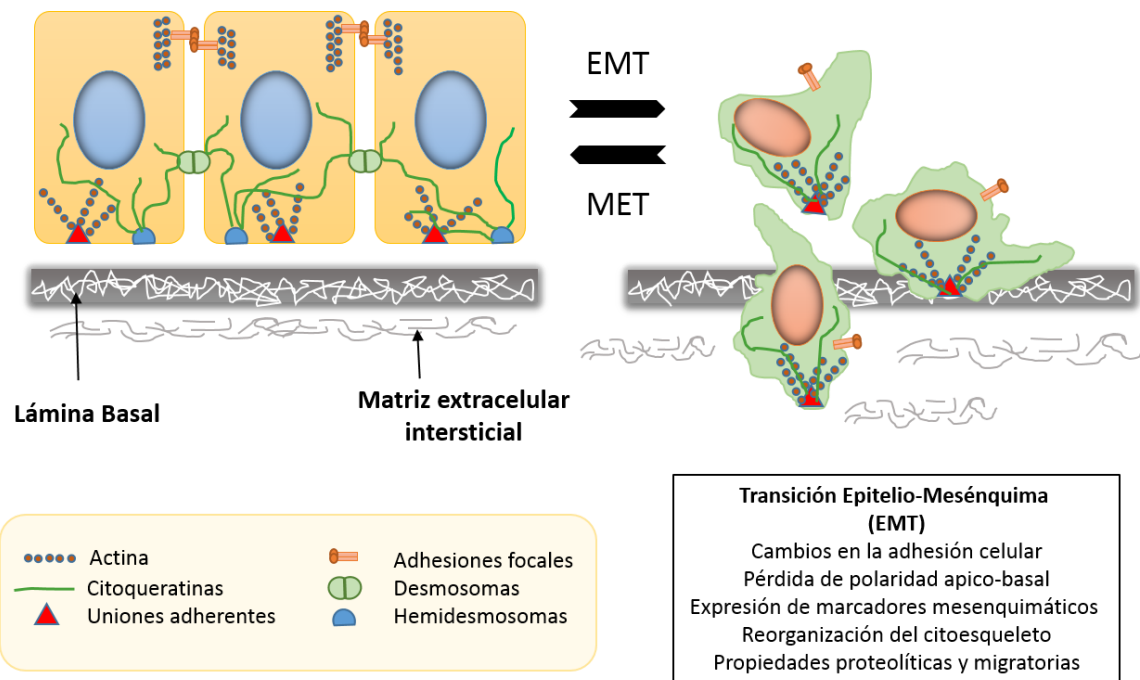
#### 2.5.4 Podoplanina y la Transición Epitelio-Mesénquima

La formación de metástasis en los tumores sólidos es un proceso complejo y multisequencial que implica varias etapas: la invasión local de las células tumorales a los tejidos adyacentes, su intravasación al torrente linfático o sanguíneo y diseminación por todo el organismo, su extravasación a órganos o tejidos distantes del tumor primario y la posterior colonización de los mismos ([Gupta and Massague 2006](#)). En los tumores de origen epitelial (carcinomas), que representan más del 90% de los tumores humanos, la invasión local implica, a su vez, varias etapas: las células tumorales tienen que desprenderse del tumor primario, proteolizar la lámina basal que separa los tejidos epiteliales de los tejidos adyacentes y adquirir capacidad migratoria. Durante la invasión local ocurren frecuentemente cambios en el fenotipo de las células tumorales reminiscentes de una EMT ([Thiery et al. 2009](#)).

La EMT es un proceso que ocurre de forma fisiológica durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y la regeneración de los tejidos. La EMT implica la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimático, lo que supone cambios drásticos en el patrón de expresión génica, asociados con la represión de genes característicos del fenotipo epitelial y con la activación de genes relacionados con el fenotipo mesenquimático, invasivo y migratorio. A la EMT relacionada con la invasión tumoral se la considera un proceso transitorio, debido a que las células de los focos metastásicos recuperan el fenotipo epitelial mediante un proceso inverso, conocido como transición mesénquima-epitelio ("Mesenchymal-Epithelial Transition", MET) (**Figura 6**). Uno de los elementos clave de la EMT es la pérdida de la expresión de cadherina E, una proteína esencial para las uniones adherentes y para el mantenimiento de la arquitectura y homeostasis tisular. Numerosos factores de transcripción han sido identificados como represores directos e indirectos de cadherina E e inductores de la EMT. Entre ellos se encuentran los factores de transcripción Snail1/2, ZEB1/2, E42 y Twist, que se unen al promotor de cadherina E y reprimen su expresión ([Batlle et al. 2000](#); [Cano et al. 2000](#); [Peinado et al. 2007](#)). Se han descrito varias vías de señalización (TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -catenina, notch) y agentes o contextos biológicos (radiación UV, hipoxia) que puede inducir la EMT.

Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión ectópica de PDPN en queratinocitos inmortalizados de ratón MCA3D y células MDCK induce una EMT asociada con un aumento de la capacidad migratoria e invasiva de estas células y con la adquisición de un fenotipo tumorogénico y metastásico ([Martin-Villar et al. 2006](#); [Scholl et al. 2000](#); [Scholl et al. 1999](#)). Esto es debido a que la expresión de PDPN induce

una reorganización del citoesqueleto de actina a través de su interacción con las ERMs y la activación de RhoA GTPasa. La activación de RhoA conduce, a través de ROCK, a la fosforilación y activación de ezrina/moesina, así como a la activación de otros efectores debajo de ROCK que promueven una reorganización del citoesqueleto, la activación del aparato locomotor, y probablemente, la activación de factores de transcripción que conducen a una EMT.



**Figura 6. Esquema de los principales cambios que ocurren durante la transición epitelio-mesénquima (EMT).** Durante la EMT las células epiteliales pierden los contactos célula-célula, cambian las propiedades de adhesión célula-ECM, adquieren actividades proteolíticas y migratorias que les confiere la capacidad de atravesar la lámina basal. En el proceso, las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimático acompañado de una reducción de la expresión de citoqueratinas y un aumento de la expresión de vimentina, así como de una reorganización del citoesqueleto de actina. El proceso MET implica la reversión al fenotipo epitelial. Esquema adaptado de [Sarrió et al., 2007](#).

## **OBJETIVOS**

---





Como objetivo general de esta tesis nos planteamos identificar si PDPN es un componente de EVs y estudiar el significado biológico de su presencia en estas vesículas. Para ello se fijaron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión de PDPN en distintos tipos de EVs (EXOs y MVs).
2. Analizar la función de PDPN en la biogénesis de EVs.
3. Profundizar en la relación de PDPN con la progresión tumoral mediante un análisis de proteómica diferencial.
4. Analizar si PDPN promueve una reprogramación del contenido proteico de EXOs asociado a la EMT mediante proteómica diferencial.
5. Estudiar la relevancia biológica de EXOs que contienen PDPN.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Cultivos celulares, transfecciones e interferencia de RNA

Las líneas celulares MDCK, MDCK-eGFP, MDCK-PDPNeGFP, MDCK-CMV y MDCK-PDPN se cultivaron en DMEM (Gibco) suplementado con 2mM glutamina, 10% FBS y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, Sigma-Aldrich). MDCK-PDPNeGFP, MDCK-eGFP, MDCK-PDPN y MDCK-CMV se obtuvieron transfectando células MDCK con vectores que codificaban para PDPN-eGFP, eGFP, PDPN y el vector vacío, respectivamente ([Martin-Villar et al. 2005](#)). Las células de carcinoma oral humano HN5 fueron infectadas con vectores lentivirales que contienen shRNAs contra PDPN humana, como se describe en ([Martin-Villar et al. 2010](#)). Las células infectadas se seleccionaron con puromicina (1 µg/ml). De esa manera se obtuvieron las líneas HN5-sh3 y HN5-sh4 con PDPN silenciado por dos shRNAs distintos. Como control, se infectaron células (HN5-sc) con una mezcla de shRNAs inespecíficos. Las células HN5-sh3, -sh4 y -sc se cultivaron en DMEM (Biowest) suplementado con 2mM glutamina, 5% FBS y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, Sigma-Aldrich). La línea celular SK-MEL-28 de melanoma humano se infectó con vectores lentivirales para la expresión de PDPN-eGFP (SK-MEL-28-PDPNeGFP) y eGFP (SK-MEL-28-eGFP). Estas células se cultivaron en las mismas condiciones que las derivadas de línea celular MDCK. Los vectores lentivirales se generaron por co-expresión de los elementos de empaquetamiento del virión, empleando los plásmidos pCMV-d8.9, pMD2G y pLKO.1, que contiene la secuencia PDPN-eGFP o eGFP, en células HEK 293T, como se describe en ([Martin-Villar et al. 2010](#)).

Las células endoteliales primarias derivadas de la vena umbilical (HUVECs) y endoteliales linfáticas dérmicas (HLECs) humanas se cultivaron en placas recubiertas de gelatina bovina (Sigma) al 0.1% en PBS, con medio EBM2 (Lonza) suplementado con un cóctel de factores de crecimiento EGM2 (Lonza). Los experimentos realizados con los cultivos primarios HUVECs y HLECs se hicieron siempre con pases inferiores a 8. Todas las líneas celulares se mantuvieron en atmósfera húmeda, a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

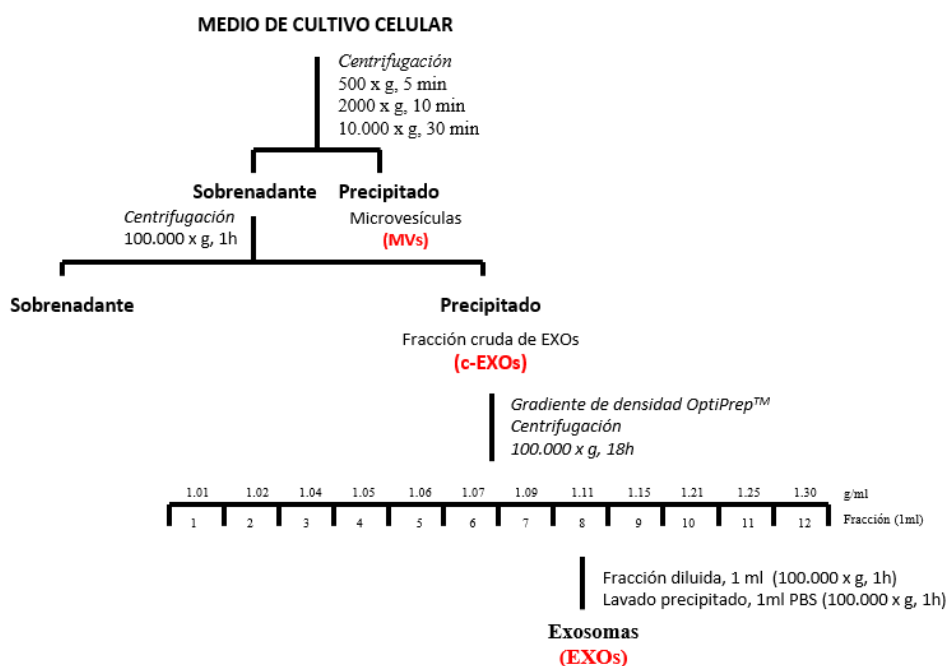
## 2. Aislamiento, purificación e identificación de vesículas extracelulares

### 2.1 Aislamiento de microvesículas y de la fracción cruda de exosomas

Las líneas celulares se cultivaron en placas de 150 mm de diámetro (Falcon®), en medio DMEM suplementado con 10% FBS libre de vesículas a una confluencia del 80 %. Las vesículas se eliminaron del suero mediante ultracentrifugación a 100.000 x *g* durante 4 h (EQ-SEM-06C, Beckman). Tras 24 h de cultivo, se recogió el medio condicionado (CM) y se centrifugó a 500 x *g* durante 5 min para eliminar las células muertas. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 2.000 x *g* durante 10 min para retirar posibles restos celulares, y el sobrenadante de esta segunda centrifugación a 10.000 x *g* durante 30 min (Beckman J2-21M/E; tubos 355607, Beckman Coulter) para aislar las MVs. La fracción cruda de EXOs (c-EXOs) se obtuvo por ultracentrifugación de este sobrenadante a 100.000 x *g* durante 1 h (EQ-SEM-06C, Beckman; Tubos 355622, Beckman Coulter), seguido de un lavado con PBS a 100.000 x *g* durante 1h (TLA-100, Optima XPN-100, Beckman; tubos 457448, Beckman Coulter). Todas las centrifugaciones se hicieron a 4°C (**Figura 7**).

### 2.2 Purificación de exosomas mediante un gradiente de densidad en Optiprep™

La fracción c-EXOs se purificó mediante un gradiente de densidad en Optiprep™. El gradiente se preparó mediante la adición de 3 ml de las soluciones de iodixanol al 40%, 20%, 10%, y 2.5 ml de la solución al 5% a un tubo de centrifuga (polyallomer) de 14 x 89 mm (Beckman Coulter). La fracción c-EXOs resuspendida en 500 µl de PBS se aplicó a la parte de arriba del gradiente y se ultracentrifugó a 100.000 x *g* durante 18 h, a 4°C. Se recogieron 12 fracciones de un 1 ml, que se centrifugaron a 100.000 x *g* durante 1 h, a 4°C. Los precipitados se lavaron en PBS (1ml) y, tras una nueva centrifugación como la anterior, se resuspendieron en 50 µl de PBS. Para determinar la densidad de cada fracción se llevó en paralelo un gradiente similar con 1ml de 0.25 M sacarosa, 10 mM Tris, pH 7.5, en lugar de la muestra. Se recogieron el mismo número de fracciones que se diluyeron 1:10.000 con H<sub>2</sub>O, y la concentración de iodixanol se determinó midiendo la absorbancia a 244 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de 320 g L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (**Figura 7**).



**Figura 7. Esquema de purificación de microvesículas y exosomas del medio condicionado.** El CM se somete a las centrifugaciones indicadas en el esquema. Tras la centrifugación a 10.000 x g se obtiene la fracción de MVs y tras una ultracentrifugación a 100.000 x g la fracción c-EXOs. Con el fin de tener una muestra pura de EXOs se realiza un gradiente de densidad en Optiprep™. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C.

### 2.3 Cuantificación de vesículas

Las EVs se cuantificaron por su cantidad total de proteína. Para ello se resuspendieron en buffer Laemmli, se sometieron a SDS-PAGE y tinción por SYPRO® ruby (Molecular Probes, Invitrogen). El gel se fijó utilizando la solución A (40% metanol, 10% ácido acético en agua destilada) durante 40 min y se incubó con 40 ml de SYPRO® ruby durante toda la noche a temperatura ambiente, en agitación y en condiciones de oscuridad. El gel, se destiñó con 50 ml de la solución B (10% metanol, 6% ácido acético en agua destilada) durante 1 h. Las imágenes fueron tomadas en un Typhoon 9410 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EE.UU) y la cuantificación se realizó usando el programa IMAGE J. Para determinar la concentración de proteína se utilizó un marcador estándar (BenchMark™) de concentración conocida (1.7 µg/µl, Invitrogen).

### 3. Caracterización de exosomas mediante microscopia electrónica e inmunomarcaje con oro coloidal

Este análisis se realizó en colaboración con el Dr. Germán Andrés de la Unidad de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular (Universidad Autónoma de Madrid).

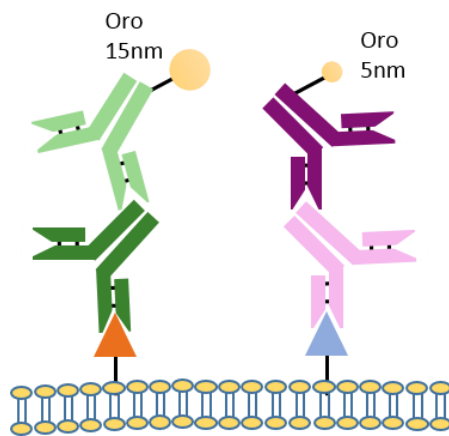
Las c-EXOs de las siguientes líneas celulares: MDCK, MDCK-PDPN, MDCK-eGFP y MDCK-PDPNeGFP se fijaron en 2% paraformaldehído (PFA) y se depositaron sobre rejillas de carbón recubiertas del polímero formvar. Tras lavar las rejillas con PBS, se incubaron con glutaraldehído al 1% y se contrastaron con acetato de uranilo al 2%. Posteriormente, se embebieron en una mezcla de acetato de uranilo al 0.8% y metilcelulosa al 2%. Las rejillas fueron examinadas usando un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 (Tokyo, Japan) a 80 kV.

Para analizar la localización de PDPN en la membrana de las vesículas, se empleó la técnica de inmunomarcaje con oro coloidal. Esta técnica se basa en la utilización de anticuerpos secundarios acoplados a nanopartículas de oro que pueden ser visualizados al microscopio electrónico, ya que el oro coloidal es opaco a los electrones (**Figura 8**). Para este fin, las rejillas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>, 1:250) o un anticuerpo para la proteína anti-eGFP (A-6455, Life technologies, 1:500). Tras lavar las rejillas con PBS, estas se incubaron con proteína A conjugada con nanopartículas de 5-nm o 15-nm (Cell Microscopy Center, Utrecht University, The Netherlands). Para la detección de GFP, las vesículas fueron permeabilizadas con 0.1% saponina durante 5 min antes del inmunomarcaje, debido a que la proteína eGFP se localiza en el lumen. Para la detección de CD63, se utilizó un anticuerpo monoclonal específico (clone H5C6, Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, 1:100) y un anticuerpo secundario conjugado con partículas de 5-nm (Aurion, Wageningen, The Netherlands).

Para el inmunomarcaje de criosecciones se utilizó la línea celular SK-MEL-28-PDPN. Las células se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro (Falcon®) y se fijaron en 2% PFA y 0.2% glutaraldehído en tampón PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> a pH 6,9) durante 2 horas, a temperatura ambiente, y se mantuvieron en 1% PFA en el tampón PHEM a 4 °C. Posteriormente, se recogieron las células con un raspador y se embebieron en 10% de gelatina, se criopreservaron durante 16 h, a 4°C, en sacarosa 2.3 M y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras fueron seccionadas en un crio-ultramicrotomo EM FCS (Ultracut UCT, Leica) a -120 ° C. Para el inmunomarcaje, se descongelaron criosecciones de 90 nm de espesor, se incubaron con el anticuerpo anti-PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>, 1:250) y el anticuerpo monoclonal anti-CD63 (clone H5C6, Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, 1:100), seguido de sus correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con nanopartículas de oro de 15-nm (CD63) y de 5-nm (PDPN) (Aurion, Wageningen, The Netherlands). Las secciones se tiñeron con una mezcla de 1.8% metilcelulosa y 0.4% acetato de uranilo y se examinaron usando un microscopio



electrónico JEOL JEM 1010 (Tokyo, Japan) a 80 kV. Todas las imágenes fueron tomadas con una cámara de 4 x 4 k CMOS F416 de TVIPS (Gauting, Alemania).



**Figura 8. Inmunomarcado con oro coloidal mediante microscopía electrónica (ME).** La figura representa antígenos unidos a sus correspondientes anticuerpos primarios que, a su vez son reconocidos por anticuerpos secundarios conjugados con nanopartículas de oro. Los distintos antígenos son identificados en función del tamaño de la partícula de oro (nm).

#### 4. Dispersión dinámica de la luz (“Dynamic Light Scattering”, DLS)

La DLS conocida también como espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica empleada para determinar el perfil de distribución de tamaños de pequeñas partículas en suspensión o de polímeros en solución. Los EXOs se resuspendieron a una concentración de 20 µg/ml en PBS y se analizaron en un tubo fotomultiplicador situado a 90° del haz de luz incidente. Se utilizó un instrumento Zetasizer nanoseries (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) y un láser de helio/neón 20 mW, 633 nm. Las muestras se analizaron a una temperatura constante de 25°C. Los datos del tamaño de las vesículas se refieren a la distribución de la intensidad de la dispersión (z-average) con una desviación estándar (Malvern Software).

#### 5. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western blot

Las células se lisaron en tampón RIPA (0.1% SDS, 0,5 % deoxicolato sódico, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, pH 8.0) suplementado con inhibidores de proteasas (2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml aprotinina y 2 mM PSMF, Sigma-Aldrich; o el cóctel inhibidor de proteasas tipo I, Calbiochem) así como inhibidores de fosfatasa (0.1 mM ortovanadato sódico, 2 mM β-glicerolfosfato y 1 mM NAF). Para la detección de las proteínas fosfo-ERM (pERM), las células se lisaron en un buffer específico con alto contenido en SDS (50 mM Tris-HCL pH 7.9, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> y 2% SDS), en cuyo caso los lisados se pasaron por una aguja de 0.4 x 13 mm hasta eliminar la viscosidad. Las cuantificaciones de proteína de los lisados celulares se realizaron con el sistema colorimétrico basado en el ácido bicinonínico (BCA, Pierce). Los extractos totales se prepararon en tampón Laemmli (Tris-HCL 6.5mM, pH 6.8,

glicerol 25%, SDS 2%, azul de bromofenol 1.01%) y se analizaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas *Immobilon-P* de PVDF (Milipore) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (5% BSA o 5% leche en polvo (Sigma) en TBS, 0.1%Tween-20, (TTBS)). Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C (para la detección de pERM) o 1h a temperatura ambiente (para el resto de proteínas) con los anticuerpos diluidos en solución de bloqueo. Después de tres lavados de 5 min con TTBS, las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes. Todos los anticuerpos utilizados, así como las diluciones empleadas, se recogen en la **Tabla 3**. El revelado se realizó con el sistema ECL (Pierce™) y las imágenes fueron digitalizadas con el programa Photoshop CS3 Extended, versión 10.0.1 (Adobe).

## 6. Análisis de la localización intracelular de proteínas mediante inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos. A continuación, las muestras se fijaron con formaldehído al 3.7% en PBS, durante 15 min, y se permeabilizaron con 0.05% Tritón X-100 en PBS durante 10 min. Los lavados se realizaron con PBS a temperatura ambiente, y las incubaciones con los anticuerpos, a 37°C, en una cámara húmeda, durante 1h, en la oscuridad. Los anticuerpos se utilizaron en una solución de 0.1% BSA en PBS a las diluciones indicadas en la **Tabla 3**. Tras tres series de lavados, se procedió a la incubación de los anticuerpos secundarios que llevaban acoplados el fluorocromo Alexa 488 (emisión en verde) o Alexa 546 (emisión en rojo) (Molecular Probes). Los núcleos celulares se tiñeron incubando con DAPI, 1 µg/ml (Sigma-Aldrich), durante 5 min, a temperatura ambiente. Para marcar los filamentos de actina, se utilizó faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa 546 (Molecular Probes) a una dilución 1:100. Por último, el montaje se realizó sobre portaobjetos con una gota del medio de montaje Prolong (Prolong Gold, Invitrogen).

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo

		APLICACIONES			
ANTICUERPO PRIMARIOS	ESPECIE	WB	IF	IP	PROCEDENCIA
<b>Ezrina (3C12)</b>	Ratón	1:5000			Sigma-Aldrich
<b>pERM</b>	Ratón	1:1000			Cell signaling
<b>CD44 (HP2/9)</b>	Ratón	1:1000			Dr. Francisco Sánchez-Madrid
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Ratón	1:10000			Sigma-Aldrich
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Ratón	1:10000			Sigma-Aldrich
<b>GFP</b>	Conejo	1:5000	1:100		Sigma-Aldrich
<b>GAPDH</b>	Ratón	1:1000			Assays Design
<b>PDPN (NZ1)</b>	Rata	1:1000	1:100	2 $\mu$ g/ $\mu$ l	Acris-Antibodies
<b>PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>)</b>	Conejo	1:8000			Dr. Miguel Quintanilla Ávila
<b>EEA1</b>	Ratón	1:1000	1:100		BD transduction laboratories
<b>CD63</b>	Ratón		1:100		Inmunostep
<b>CD63</b>	Ratón	1:1000			Calbiochem
<b>PS1</b>	Conejo	1:1000			Abcam
<b>Alix</b>	Ratón	1:1000			Cell signaling
<b>TSG101</b>	Ratón	1:1000			BD transduction laboratories
<b>Cadherina E</b>	Conejo	1:1000			Cell signaling
<b>Cadherina N</b>	Conejo	1:1000			Cell signaling
<b>TGN46</b>	Conejo	1:1000			Cell signaling
<b>CD9</b>	Ratón	1:1000		1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Santa Cruz
<b>Flotilina 1</b>	Mouse	1:1000			BD transduction laboratories
<b>Anexina A7</b>	Cabra	1:1000			Santa Cruz
ANTICUERPO SECUNDARIOS	ESPECIE	WB	IF	IP	PROCEDENCIA
<b>IgG rata-HRP</b>	Cabra	1:5000			Santa Cruz
<b>IgG ratón-HRP</b>	Oveja	1:2000			GE Healthcare
<b>IgG conejo-HRP</b>	Burro	1:5000			GE Healthcare
<b>IgG ratón-Alexa 488</b>	Cabra			1:500	Molecular Probes
<b>IgG rata-Alexa 546</b>	Cabra			1:500	Molecular Probes

HRP, horseradish-peroxidase.

## 7. Análisis de la internalización de podoplanina mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal

Para los experimentos de internalización de PDPN *in vivo* se emplearon las líneas celulares MDCK-PDPN y HN5. Las células cultivadas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro se incubaron durante 30 min a 37°C con medio DMEM (Gibco) en ausencia de suero. Tras varios lavados con la solución salina equilibrada Hank (HBSS, Life Technologies) suplementada con 20 mM Hepes (pH 7.2) y 2% BSA (Sigma-Aldrich), las células se incubaron con el anticuerpo anti-PDPN NZ1 (1:200) durante 1h, a 4°C. La incubación de las células vivas con el anticuerpo determina que sólo se marque PDPN localizada en la superficie. La baja temperatura es para reducir el metabolismo celular y ralentizar el tráfico de membranas. A continuación, las células se lavaron tres veces con la misma solución (HBSS, Hepes-BSA), a 4°C, y se incubaron a 37°C para favorecer la endocitosis. A los tiempos indicados, se fijaron las células con formaldehído al 3,7%, durante 10 min y se siguió con el protocolo de inmunofluorescencia previamente descrito para los estudios de colocalización de PDPN con EEA1 y CD63. El análisis se llevó a cabo en un Microscopio confocal espectral LSM710, 63X (Zeiss).

## 8. Captura de vesículas mediante inmunopartículas magnéticas

Se utilizaron 200 µg de c-EXOs derivados de células MDCK-PDPN, en un volumen de 1ml de PBS. Las Dynabeads-Protein A se incubaron toda la noche a 4°C, en agitación suave, con el anticuerpo anti-PDPN NZ1 o su correspondiente control negativo (IgG de rata, Jackson), empleando en todos los casos 1 µg de anticuerpo por muestra. A continuación, las muestras se incubaron con Dynabeads-anticuerpo (Life Technologies) durante 2 h, con agitación suave, a 4°C, y se lavaron 3 veces con PBS siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial con la ayuda de un imán/magneto. La elución del complejo Dynabeads-Anticuerpo-EV se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes y reductoras con tampón Laemmli, y las proteínas de interés se detectaron mediante Western blot con los anticuerpos correspondientes (**Tabla 3**).

## 9. Ensayos de proliferación celular (MTT)

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, que origina un compuesto de color morado e insoluble en soluciones acuosas (formazán). De este modo se puede determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es empleado para medir la

supervivencia y proliferación celular. La cantidad de formazán generado es directamente proporcional al número de células viables.

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células de las líneas MDCK-CMV y MDCK-PDPN en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon®) en medio de cultivo (DMEM), con 10% FBS o ausencia de suero, durante 24 h. El reactivo MTT (Sigma-Aldrich) se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 50 µg/ml por pocillo y se incubó a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 4 h. A continuación, se añadieron 100 µl de isopropanol a 37°C para solubilizar los cristales de formazán. Tras 1 h se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (VersaMax ELISA, Molecular Devices).

## 10. Ensayos de viabilidad celular con azul tripán

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el método de tinción con azul tripán y conteo de células en una cámara de Neubauer. El azul tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, capaz de teñir de color azul solamente las células muertas o aquellas en las que la membrana celular ha sido dañada. Las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante. A este método también se le denomina ensayo de exclusión de colorantes vitales.

Se sembraron  $2 \times 10^6$  células de las líneas MDCK-CMV y MDCK-PDPN en placas de cultivo de 6 pocillos (Falcon®) y se cultivaron en medio (DMEM) con 10% FBS o sin suero durante 24 h. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 500 x g durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de PBS y se realizó una dilución 1:2 con la solución de azul de tripán 0.4 % (Sigma-Aldrich). El número total de células vivas se determinó mediante recuento celular en cámara de Neubauer (BRAND®) con un microscopio de contraste de fases (Wilovert® standard).

## 11. Análisis de la expresión de mRNA de podoplanina en vesículas mediante RT-PCR

Para la extracción del RNA total de vesículas se utilizó el kit “RNeasy Plant Mini kit” (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La concentración del RNA, así como su pureza (ratio A260:A280  $\geq 1,8$ ), se determinaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND1000, Nanodrop Technologies).

Para la transcripción reversa de los RNA se empleó la enzima MVL (Promega) según las indicaciones del fabricante, partiendo de la misma concentración de RNA en todas las muestras y el cDNA resultante fue utilizado como molde de la reacción de PCR. Para ello, se utilizó la enzima DNA polimerasa de Biotools, la mezcla de dNTPs, el tampón de reacción y los siguientes cebadores específicos para PDPN:

Directo: 5'CGGGAACGATGTGGAAGGTGTCA-3'y

Reverso: 5'GGGACAGGGCACAGAGTCAGAAAC 3'

Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% con SYBRSAFE (Life Technologies) y las imágenes se obtuvieron con Bioimaging system (Syngene).

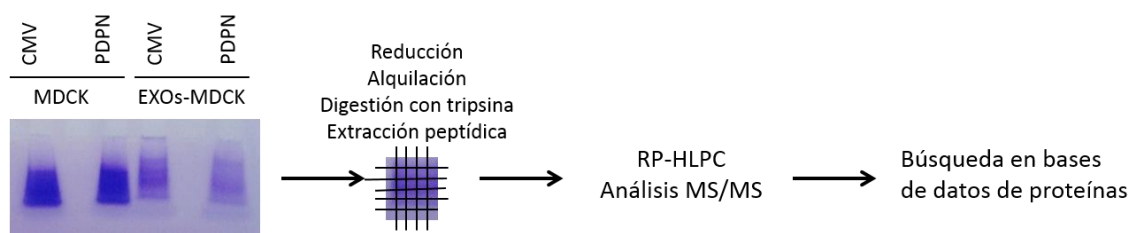
## 12. Análisis proteómico

El análisis proteómico presentado en esta Tesis se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Richard Simpson durante mi estancia en Melbourne (Australia). Tanto los métodos de preparación de la muestra como los criterios utilizados para la interpretación de los resultados se basaron en el estudio de [\(Tauro et al. 2013\)](#).

### 12.1 Preparación de las muestras

Para los estudios de proteómica se emplearon 10 µg de extractos de proteínas celulares y de EXOs de las líneas celulares MDCK-CMV y MDCK-PDPN. Las muestras se lisaron en tampón SDS (50 mM Tris-HCL pH 7.9, 100 mM NaCL, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> y 1% SDS) y se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) para separar las proteínas de acuerdo a su masa. Para la visualización de las mismas en el gel, se empleó la tinción con "coomassie blue" (Sigma-Aldrich). A continuación, se cortaron las bandas manualmente para la digestión y obtención de sus correspondientes péptidos. Antes de añadir la enzima al trozo de gel con las proteínas de interés, este se destiñó mediante sucesivos lavados con la solución 50 mM de bicarbonato amónico/acetonitrilo (ACN) (1:1). La obtención de los péptidos se llevó a cabo mediante una reducción con 10 mM DTT en 50 mM de bicarbonato de amónico (Calbiochem), durante 30 min, a 56°C, seguida de una alquilación con 50 mM de iodoacetamida en 50 mM de acetonitrilo (Fluka), durante 30 min, a 22 °C, en la oscuridad. Entre un paso y otro se eliminaron los reactivos mediante una centrifugación (spin) a baja velocidad. Antes de añadir la enzima de digestión (tripsina), el gel se deshidrató mediante lavados sucesivos con ACN. Este paso favorece que la enzima se incorpore eficientemente por difusión cuando el gel es rehidratado con el buffer de digestión. A continuación, se añadieron 0,2 µg de tripsina en el buffer de digestión 10 mM bicarbonato amónico, 10% ACN, 5 mM CACL<sub>2</sub> (Promega) durante 16 h a 37 °C, como se describe en [\(Shevchenko et al. 2006\)](#). Una vez llevada a cabo la reacción enzimática, los péptidos generados se extrajeron del gel por difusión con ácido trifluoroacético (TFA) y ACN. Las sales, tampones y contaminantes de los péptidos extraídos se eliminaron por cromatografía de intercambio catiónico (Zip-tip de C18, Millipore) y elución. Los péptidos se liofilizaron, se acidificaron con una solución tampón que contenía 0,1% FA y 2% de ACN y se

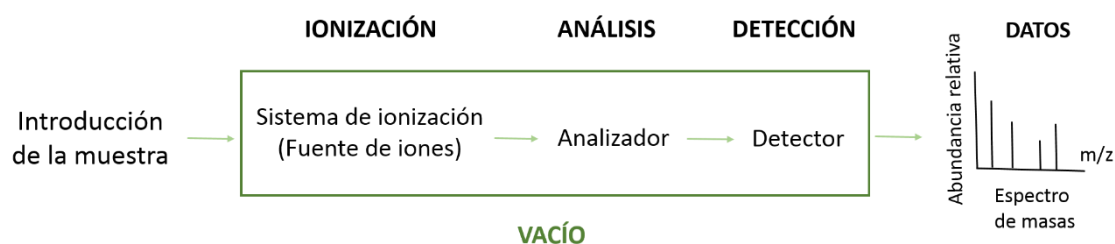
introdujeron en un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) Orbitrap Elite, a través de una columna HPLC nano flujo (Ultimate 3000 RSLC nano, Thermo Fisher Scientific). Los experimentos de proteómica se realizaron por duplicado (**Figura 9**).



**Figura 9. Análisis proteómico.** Las fracciones celulares y EXOs purificados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN se fraccionaron en SDS-PAGE. A continuación, se cortaron las bandas y se llevó a cabo la reacción enzimática para la obtención de los péptidos. Los péptidos se separaron mediante una cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) y se analizaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Finalmente se identificaron las proteínas mediante una búsqueda en las bases de datos.

## 12.2 Nociones básicas sobre espectrometría de masas

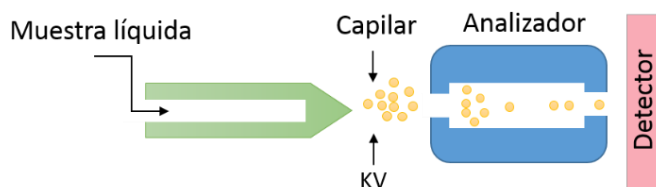
La Espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica y obtener información cualitativa o cuantitativa. Mediante el análisis por MS es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como información estructural del mismo o, simplemente, detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. Para ello es necesario ionizar las moléculas mediante una fuente de ionización y obtener los iones formados en fase gaseosa. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación  $m/z$  de los iones detectados (**Figura 10**) (Graham et al. 2007).



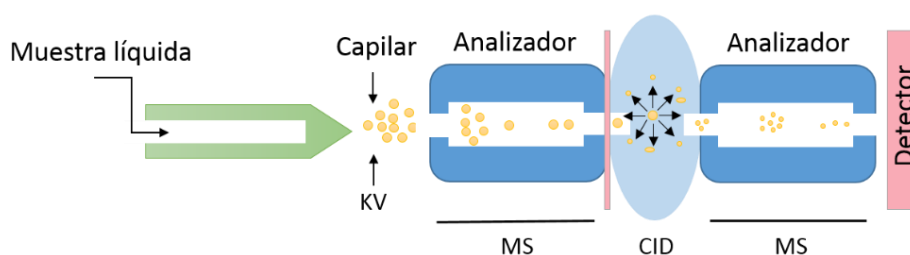
**Figura 10.** Esquema de un espectrómetro de masas.

En nuestro trabajo, hemos utilizado un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS). Esto se denomina al acoplamiento de dos analizadores de masas unidos por una cámara de colisión ("Collision-Induced Dissociation", CID) que fragmenta las moléculas. El primer analizador sirve para seleccionar un ión determinado entre los iones producidos en el sistema de ionización, denominado *ión precursor*. A continuación, pasa a la CID con un gas (helio, nitrógeno o argón) y se fragmenta de nuevo en pequeños iones denominados *iones productos*, los cuales entran a otro analizador acoplado a un detector que nos dará un espectro de masas. En la **Figura 11** se presenta una comparación sencilla entre MS y MS/MS (Ho et al. 2003; Pitt 2009).

#### ESPECTRÓMETRO DE MASAS (MS)



#### ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)



**Figura 11. Comparación entre un espectrómetro de masas (MS) y un espectrómetro en tándem (MS/MS).** (A) La muestra es ionizada por un electrodifusor. Los iones atraviesan un analizador donde se separan por la  $m/z$  y van a parar a un detector para obtener su espectro de masas. (B) Se emplean dos analizadores separados por una CID. La muestra ionizada entra en el primer analizador donde los iones se separan por la  $m/z$  y se seleccionan individualmente para entrar en la CID, donde de nuevo son fragmentados en más iones. A continuación, pasan a un segundo analizador acoplado a un detector, para obtener el espectro de masas.



### 12.3 Bases de datos e identificación de las proteínas

La identificación de las proteínas en relación a su espectro de fragmentación se llevó a cabo mediante programas informáticos. Los espectros de masas se analizaron con los programas Mascot (Matrix Science, London, UK; v 1.4.0.288) y Sequest (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, v 1.4.0.288) contra la base de datos Uniprot (Octubre 2013) para las proteínas humana, canina y bovina. La búsqueda se configuró en función de los mismos parámetros que se describen en (Tauro et al. 2013).

### 12.4 Validación estadística de los resultados en las bases de datos

Una vez obtenidos los resultados del análisis proteómico, el siguiente paso fue la interpretación de estos datos mediante ecuaciones estadísticas, para ello se utilizó el ratio de cuentas espectrales ( $R_{SC}$ ) que se determinó como se describe en (Mathivanan et al. 2012; Tauro et al. 2013):

$$R_{SC} = (n_{EXOS-PDPN} + f)(t_{EXOS-CMV} - n_{EXOS-CMV} + f) / n_{EXOS-CMV} + f)(t_{EXOS-PDPN} + f)(t_{EXOS-PDPN} - n_{EXOS-PDPN} + f).$$

Esta Ratio nos permite correlacionar el número de péptidos identificados de una misma proteína en dos muestras. Un valor positivo  $R_{SC}$  indica que el número de espectros identificados para EXOs-PDPN es mayor que para la muestra control (MDCK-CMV o EXOs-CMV) y, por consiguiente, se interpreta como un incremento de la expresión de esa proteína.

## 13. Ensayo de migración e invasión *in vitro*

La capacidad migratoria e invasiva de las células MDCK se analizó usando cámaras Transwell con un diámetro de poro de 8  $\mu$ m, con el filtro sin recubrir (migración) o recubierto con Matrigel (invasión) (BD Biosciences). Se sembraron  $10^4$  células en 500  $\mu$ l de medio DMEM 0.1 % FBS en el compartimento superior, a los que se añadieron 30  $\mu$ g/ml de c-EXOs o el mismo volumen de PBS. En el compartimento inferior se añadió DMEM, 5% FBS. Tras 16 h de incubación se retiró el Transwell del pocillo y, con una punta de algodón, se retiró el exceso de medio y las células del compartimento superior que no habían migrado. Seguidamente, se sumergieron los Transwell en 500  $\mu$ l de etanol 100 %, lo que permitió la fijación de las células. A continuación, se tiñeron las células con 500  $\mu$ l de cristal violeta al 0.2% durante 15 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de cristal violeta y se dejaron secar a

temperatura ambiente. Las células que habían migrado al reverso del filtro se contaron bajo un microscopio invertido de contraste de fases (Wilovert® standard).

#### **14. Ensayo de angiogénesis y linfangiogénesis *in vitro***

Para el ensayo de formación de estructuras capilares en Matrigel se sembraron  $10^5$  células (HUVEC o HLEC) en placas de 24 pocillos recubiertas con Matrigel bajo en factores de crecimiento (Corning), en medio EGM-2/EBM-2, con o sin 40 µg/ml de c-EXOs. Para comprobar la especificidad de PDPN, la fracción c-EXOs se preincubó con las concentraciones indicadas (0,5 µg/ml y 1 µg/ml) de anticuerpo NZ1, que reconoce el dominio EC de la proteína, o con IgG de rata (1 µg/ml) durante 1 h, a 4°C. La organización de las células en el Matrigel se analizó microscópicamente. Se tomaron fotografías entre las 2h y 6h después de sembrar las células. Los datos se expresan como la media de la longitud de los tubos  $\pm$  S.E.M (error estándar de la media, Software Image J), en unidades arbitrarias, o como el número de estructuras tubulares completamente cerradas por campo. Se contaron 3 campos diferentes por pocillo en determinaciones por triplicado.

#### **15. Ensayo de tumorigenicidad en ratones atímicos**

Se inyectaron  $\sim 2,5 \times 10^6$  células de las líneas celulares HN5-sc, -sh3 y -sh4 en cada flanco de ratones nu/nu (Harlan) de 8 semanas de edad. La inyección fue intradérmica/subcutánea. Se midió el tamaño de los tumores con un calibrador (dos diámetros ortogonales) a distintos tiempos. Al final del experimento, los ratones se anestesiaron, se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los tumores, los cuales se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento para Western blot. Para lo cual, los tumores se disgregaron con tijeras y se homogenizaron utilizando un rotor Polytron (PT 1200 E, Kinematica). Las muestras homogeneizadas se incubaron con tampón RIPA (0.1% SDS, 0,5 % deoxicolato sódico, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, pH 8.0) durante 30 min, a 4°C y, posteriormente, se centrifugaron a  $12.000 \times g$  durante 15 min a 4°C para decantar la fracción lipídica insoluble de la fracción proteica. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (BioRad). Para determinar la especificidad de las bandas correspondientes a PDPN se preincubó el anticuerpo NZ1 con el péptido del dominio EC de PDPN que se utilizó como inmunógeno (p37-51) para generar el anticuerpo, a una concentración de 3 µg/ml, durante 30 min, a 4°C, en agitación, y, a continuación, se siguió con el protocolo de Western blot.

## 16. Ensayo de cicatrización de heridas *in vivo*

Para los experimentos de cicatrización de heridas en piel se emplearon ratones nu/nu (Harlan) de 6 semanas de edad, previamente anestesiados con isofluorano. Se realizaron dos heridas por ratón con un bisturí circular o *punch* de 4 mm de diámetro, empleando 3 ratones para cada uno de los tratamientos con c-EXOs-CMV, c-EXOs-PDPN y PBS. Cada 2-3 días después de la incisión, y durante 9 días, se inyectaron 10 µg de c-EXOs en 100 µl de PBS o el mismo volumen de PBS, repartidos en los dos bordes de la herida. Para medir el cierre de las heridas, estas se calcaron en una película transparente puesta sobre la herida y las áreas se calcularon utilizando el programa Image J y el software GraphPad Prism 5.0 para el análisis estadístico. Al área inicial de cada herida (día 0) se le dió el valor de 100, y los valores de las áreas en los días posteriores se expresaron como porcentajes con respecto al tiempo 0.

## 17. Análisis estadísticos

Para la cuantificación de MVs y EXOs aislados de diferentes líneas celulares y para los ensayos de angiogénesis y linfangiogénesis *in vitro* se llevaron a cabo 2-3 experimentos independientes (tal como se indica en los pies de figura). Los datos se representan como la media  $\pm$  S.E.M (error estándar de la media). Se realizó un análisis unidireccional de varianza seguido de una comparación múltiple por Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0. y los datos fueron considerados significativos si  $p < 0,05$ . En las figuras se indican con asteriscos los niveles de significación \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



## RESULTADOS

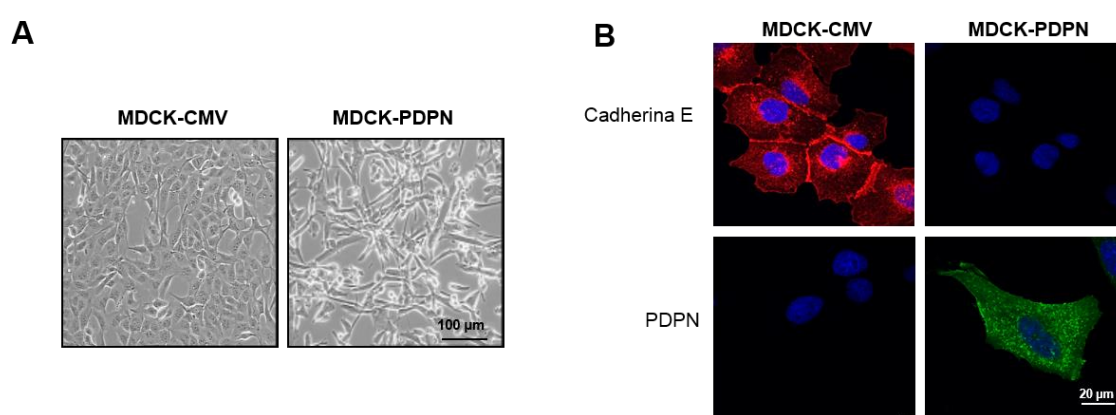
---



## PARTE I. CARACTERIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE PODOPLANINA EN VESÍCULAS EXTRACELULARES

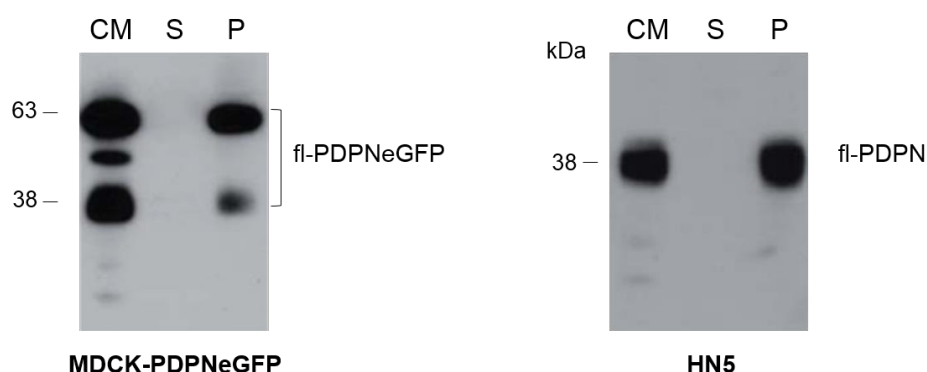
### 1. Resultados preliminares

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión ectópica de PDPN en células MDCK (MDCK-PDPN) inducía una EMT que se correlacionaba con la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimático (**Figura 12A**). Este cambio morfológico iba acompañado de la pérdida del marcador epitelial cadherina E (**Figura 12B**) y la inducción del marcador mesenquimático cadherina N (Martin-Villar et al. 2006).



**Figura 12. Podoplanina induce una EMT en células MDCK. (A)** Las micrografías de contraste de fase de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN muestran una morfología epitelial y fibroblástica, respectivamente. **(B)** Detección de cadherina E y PDPN mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal.

Con el fin de investigar si PDPN era secretada al medio extracelular, células MDCK-PDPNeGFP que expresan la proteína PDPN fusionada a eGFP, y células HN5 derivadas de un SCC humano oral, que expresan PDPN endógena, se condicionaron con medio en ausencia de suero. Como se observa en la **Figura 13**, en el medio condicionado (“Conditioned Medium”, CM) se detectó la presencia de la proteína entera plenamente glicosilada. Cuando los CMs se centrifugaron a  $100.000 \times g$  durante 1 h, la proteína se aisló en el pellet (P) y no en el sobrenadante (S), sugiriendo su presencia en una fracción particulada secretada por las células.



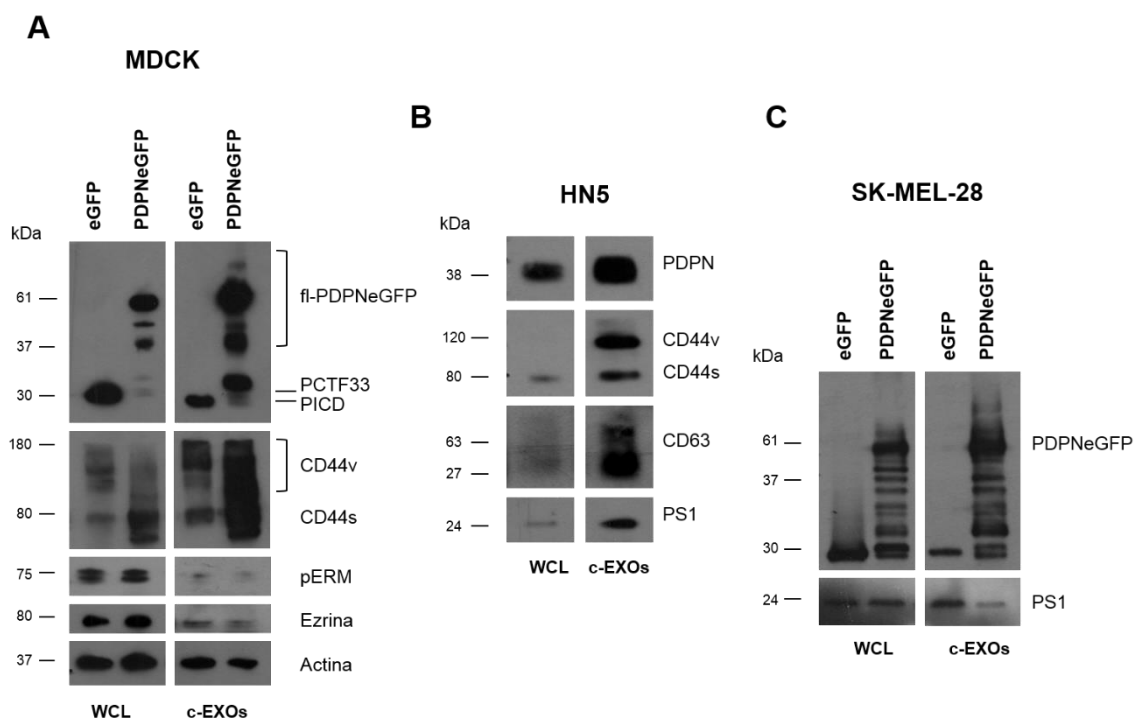
**Figura 13. Análisis mediante Western blot de la expresión de podoplanina en el medio condicionado.** Las células se condicionaron con medio de cultivo en ausencia de suero durante 24 h. Tras su centrifugación a  $100.000 \times g$  se obtuvo el pellet (P) y el sobrenadante (S). Se detectó la proteína intacta plenamente glicosilada (fl-PDPNeGFP y fl-PDPN) en el CM y en la fracción P de ambas líneas celulares.

## 2. Podoplanina es secretada al medio asociada a vesículas extracelulares

Para analizar la presencia de PDPN en EVs, se aisló la fracción cruda de EXOs (c-EXOs) de diferentes líneas celulares: MDCK-eGFP, MDCK-PDPNeGFP, SK-MEL-28-eGFP, SK-MEL-28-PDPNeGFP y HN5 mediante centrifugación diferencial del medio condicionado, tal y como se describe en Materiales y métodos. SK-MEL-28 es una línea celular de melanoma humano que no expresa PDPN de manera endógena. Las líneas celulares MDCK y SK-MEL-28 fueron transfectadas con vectores que codifican la proteína de fusión PDPN-eGFP o sólo eGFP, como control. Mediante Western blot se analizó la presencia de PDPN junto a otros marcadores conocidos de EVs, CD63 y CD44, en los lisados celulares (WCL) y en la fracción c-EXOs (**Figura 14**). En la figura se observa que, tanto en el lisado celular como en la fracción de c-EXOs, la expresión de la isoforma estándar de CD44 (CD44s) aumenta en MDCK-PDPNeGFP con respecto MDCK-eGFP. Esto es debido a que PDPN induce la expresión de esta isoforma como consecuencia de la EMT que promueve en estas células ([Martin-Villar et al. 2010](#)). La fracción c-EXOs también contienen ezrina y moesina (**Figura 14A**), cuyas formas fosforiladas (pERM) se unen tanto a PDPN como a CD44 ([Martin-Villar et al. 2006](#); [Scholl et al. 1999](#); [Yonemura et al. 1998](#)). PDPN sufre un procesamiento proteolítico constitutivo por una metaloproteasa (aún no identificada), seguido de un corte intramembrana dependiente de la actividad de presenilina-1(PS-1)/  $\gamma$ -secretasa, que da lugar a un fragmento asociado a la membrana de  $\sim 33$  kDa (PCTF33) y un fragmento citosólico de  $\sim 29$  kDa que contiene el dominio intracelular de la proteína (PICD) ([Yurrita et al. 2014](#)). Tanto PCTF33 como PICD estaban presentes junto con la proteína completa (fl-PDPNeGFP) en la fracción c-EXOs aislada de la línea celular MDCK-PDPNeGFP (**Figura 14A**), lo que sugiere que la escisión de PDPN también puede



ocurrir en las vesículas, como sucede con CD44 y cadherina 17 (Bernhard et al. 2013; Stoeck et al. 2006). De hecho, la subunidad catalítica de la  $\gamma$ -secretasa, PS-1, también se incorpora a estas vesículas (Figura 14B,C).

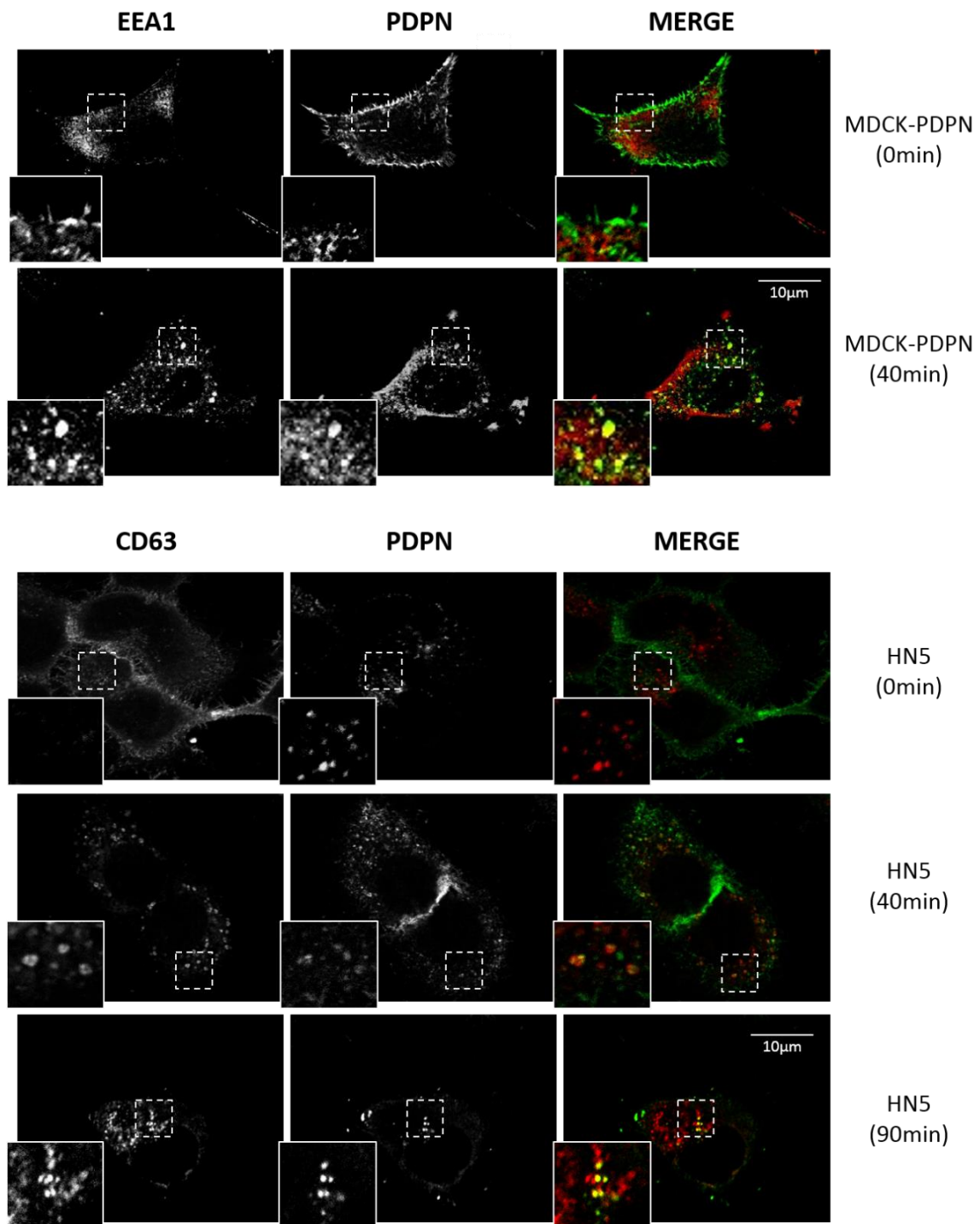


**Figura 14. Expresión de podoplanina en vesículas extracelulares secretadas por distintas líneas celulares.** Se aisló la fracción c-EXOs de las líneas celulares MDCK (A) y SK-MEL-28 (C), transfectadas con vectores que codifican para la proteína PDPNeGFP o eGFP, y HN5 (B). En los lisados celulares (WCL) y en la fracción c-EXOs se analizó la presencia de PDPN y de las proteínas indicadas mediante Western blot. CD44v y CD44s se refieren a las isoformas variables y estándar de CD44, respectivamente.

## 2.1 Las vesículas extracelulares contienen el mRNA de podoplanina

Diversos estudios han demostrado que las EVs pueden llevar a cabo una transferencia horizontal de material genético debido a su contenido en mRNAs y miRNAs. Un estudio reciente ha identificado una secuencia específica no codificante en el extremo 3'UTR de los mRNAs transportados en EVs. Esta secuencia de ~ 25 nt, con un motivo central CTGCC, parece ser necesaria para que los transcritos se incorporen a las vesículas (Bolukbasi et al. 2012). En la región 3'UTR del mRNA de PDPN observamos varias secuencias con una alta homología respecto a la secuencia consenso, de las que la denominada PDPN-3 presentaba el mayor grado de identidad (Figura 15A). Debido a este resultado, analizamos la expresión del mRNA de PDPN en la fracción c-EXOs aislada de las líneas celulares HN5 y MDCK-PDPN mediante la





**Figura 16. Podoplanina es internalizada en vesículas endocíticas.** Células MDCK-PDPN y HN5 se marcaron *in vivo* a 4°C con un anticuerpo específico que reconoce el dominio EC de PDPN. Tras incubar las células a 37°C a los tiempos indicados, estas se fijaron, y se analizó la colocalización de PDPN con el marcador de endosomas tempranos EEA1 y el marcador de endosomas tardíos/MVBs CD63 mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran un plano de corte longitudinal intermedio.

#### 4. Podoplanina se localiza en la membrana de vesículas extracelulares

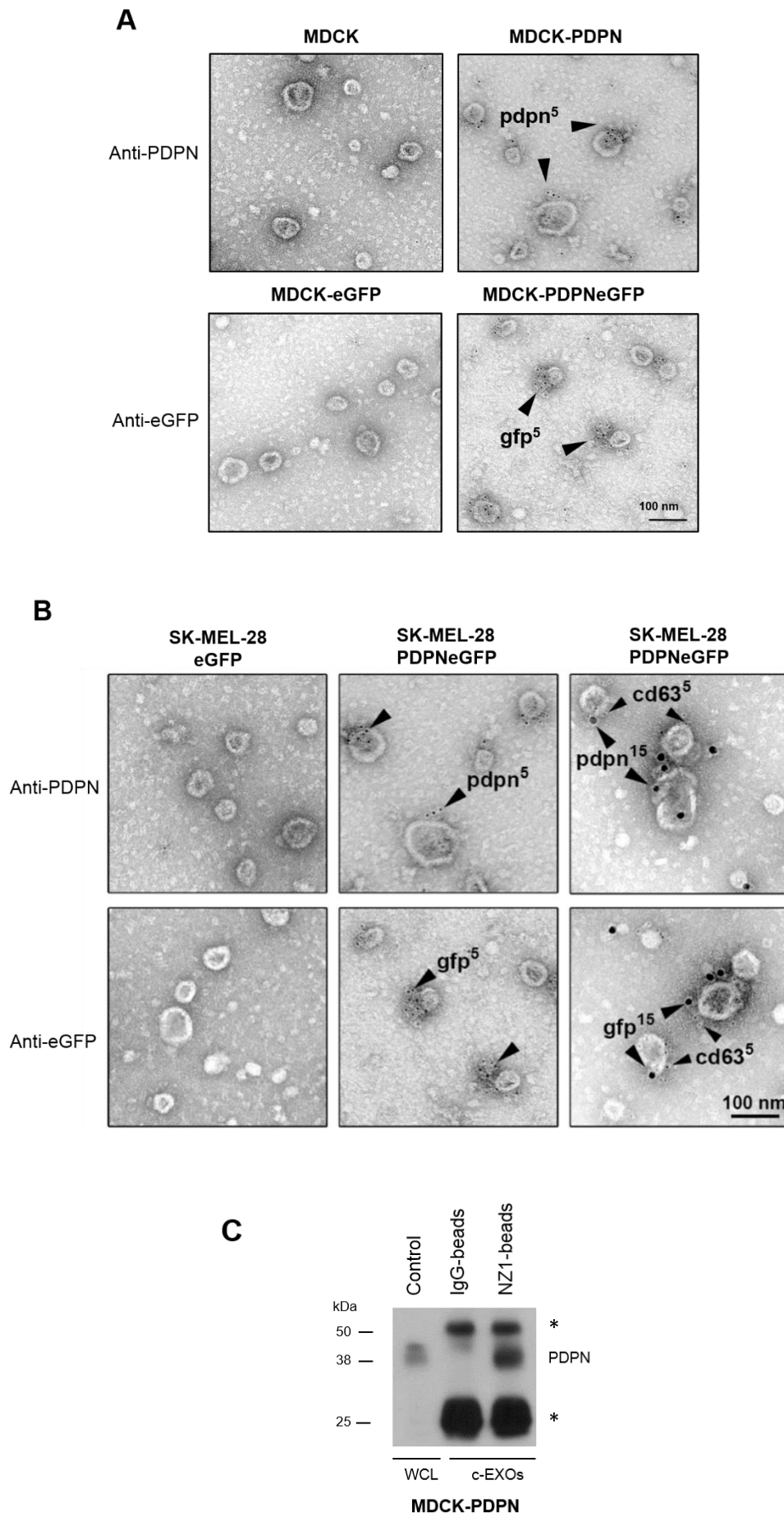
La localización de PDPN en EVs se confirmó mediante inmunomarcaje con oro coloidal y microscopia electrónica de la fracción c-EXOs aislada de células MDCK-PDPN, MDCK-PDPNeGFP y SK-MEL-28-PDPNeGFP. Para ello, se emplearon dos anticuerpos, uno dirigido contra el ectodominio de PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>) y otro contra la etiqueta eGFP del dominio intracelular. Para el análisis de eGFP, las vesículas fueron previamente permeabilizadas con saponina para permitir el acceso del anticuerpo al interior. En la **Figura 17A** se muestra la localización de PDPN en la fracción c-EXOs de células MDCK-PDPN y MDCK-PDPNeGFP (pdpn<sup>5</sup> y gfp<sup>5</sup>). En la **Figura 17B**, se muestra la colocalización de PDPN (pdpn<sup>15</sup>, gfp<sup>15</sup>) y CD63 (CD63<sup>5</sup>) en vesículas de SK-MEL-28-PDPNeGFP. La detección de CD63 en c-EXOs de MDCK no se pudo realizar debido a que el anticuerpo utilizado no reconoce la proteína canina. Las vesículas marcadas para PDPN y CD63 tenían un diámetro de 72±19 nm (n=20), compatible con el tamaño de los EXOs.

Para confirmar que la inserción de PDPN en la membrana de las vesículas tenía la misma orientación que en la membrana plasmática, es decir, con el dominio EC hacia afuera, c-EXOs aislados de células MDCK-PDPN se incubaron con partículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo NZ1 dirigido contra el dominio EC de PDPN (NZ1-beads) o recubiertas con IgG como control. Las partículas se separaron y se lavaron en el imán, y se comprobó que las NZ1-beads habían retenido vesículas PDPN-positivas mediante Western blot con el anticuerpo anti-PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>) (**Figura 17C**).

---

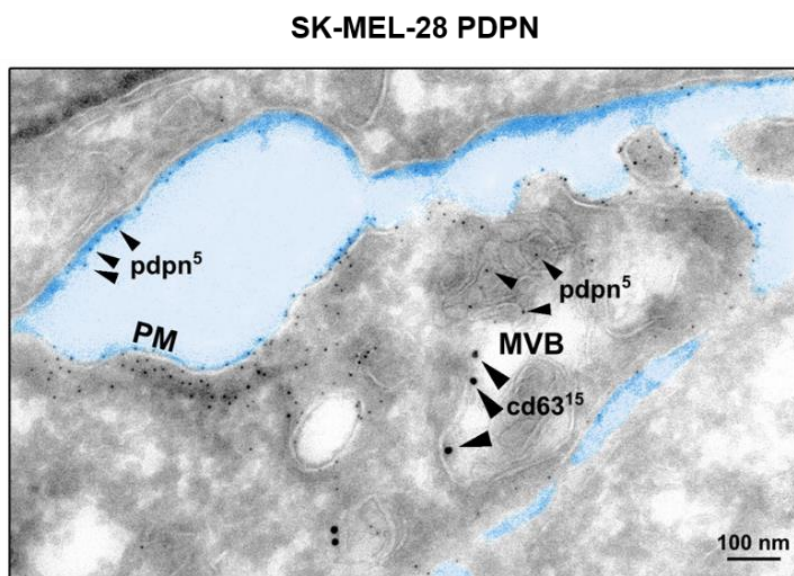
(Página siguiente)

**Figura 17. Detección de podoplanina en vesículas extracelulares mediante inmunomarcaje con oro coloidal y microscopia electrónica. (A)** EVs aisladas de MDCK, MDCK-eGFP, MDCK-PDPN y MDCK-PDPNeGFP se marcaron con los anticuerpos D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>, que reconoce el dominio EC de PDPN (pdpn<sup>5</sup>), y un anti-GFP (gfp<sup>5</sup>) que reconoce el dominio CT de PDPNeGFP. Obsérvese que la tinción anti-PDPN y anti-GFP en EVs de MDCK y MDCKeGFP es negativa. **(B)** EVs aisladas de SK-MEL-28-eGFP y SK-MEL-28-PDPNeGFP se marcaron con los mismos anticuerpos anti-PDPN (pdpn<sup>5</sup> y pdpn<sup>15</sup>) y anti-GFP (gfp<sup>5</sup> y gfp<sup>15</sup>) que en el apartado anterior y con un anticuerpo específico contra CD63 (cd63<sup>5</sup>). La tinción con anti-PDPN y anti-GFP en SK-MEL-28-eGFP fue negativa. **(C)** Ensayo de retención de EVs-PDPN positivas con partículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal (rata) NZ1 que reconoce el dominio EC de PDPN. Como control se utilizaron partículas magnéticas recubiertas con IgG de rata. Tras la incubación de las EVs con las partículas, estas se resuspendieron en tampón Laemmli y se sometieron a un Western blot con un anticuerpo policlonal anti-PDPN (D<sub>2</sub>B<sub>4</sub>). Las bandas marcadas con asterisco corresponden a la cadena ligera y pesada de la IgG. En el carril Control se aplicó un extracto de células MDCK-PDPN.





También se detectó la presencia de PDPN (pdpn<sup>5</sup>) y CD63 (cd63<sup>15</sup>) en vesículas intraluminales de los MVBs en criosecciones de células SK-MEL-28-PDPNeGFP (**Figura 18**). Se observó que la mayor parte del marcaje de PDPN tenía lugar en la membrana plasmática (PM), y sólo esporádicamente se detectó la presencia de PDPN en MVBs, lo que sugiere que únicamente una pequeña fracción de la proteína de la superficie celular se internaliza en endosomas tempranos o, alternatively, que PDPN se recicla activamente desde endosomas a la membrana plasmática.

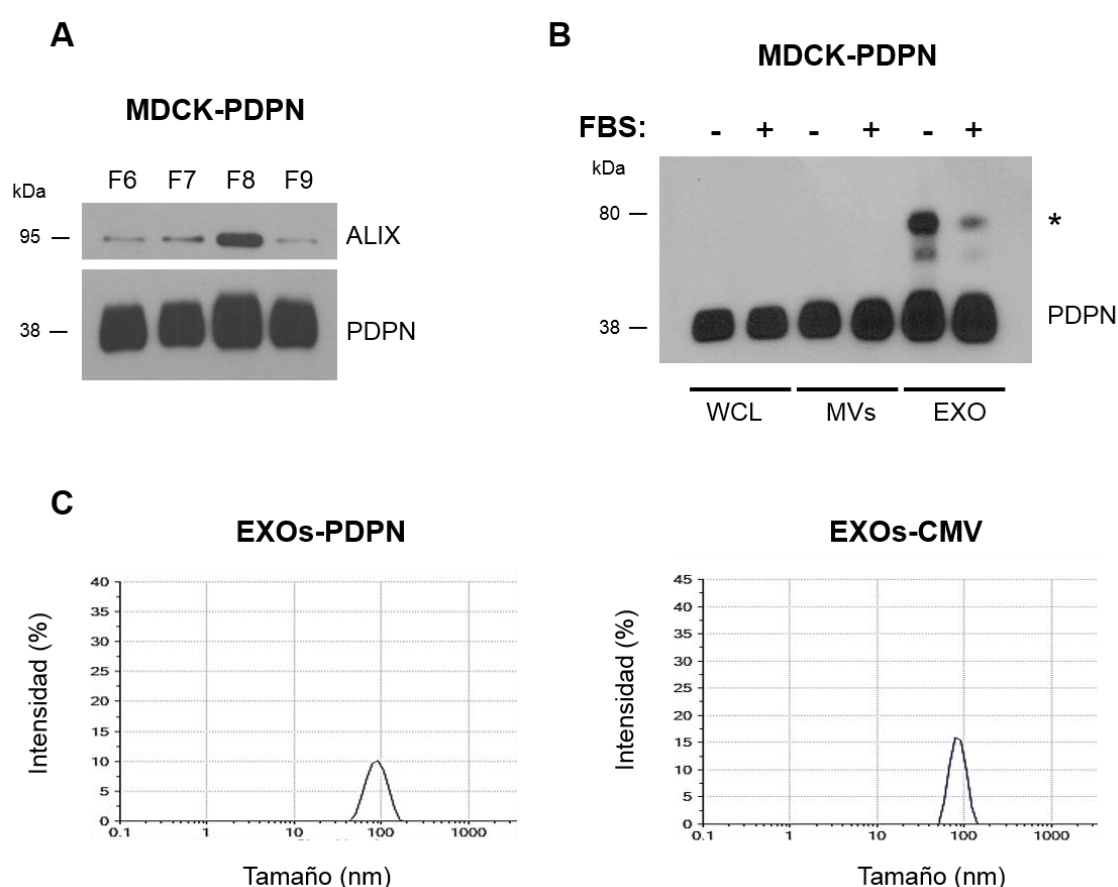


**Figura 18. Detección de podoplanina en criosecciones de células SK-MEL-28-PDPNeGFP mediante inmunomarcaje con oro coloidal y microscopía electrónica.** PDPN se marcó con un anticuerpo policlonal específico y, como secundario, la proteína A conjugada con partículas de oro de 5 nm. CD63 se marcó con un anticuerpo monoclonal específico y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con partículas de oro de 15 nm. PDPN se detecta en ILVs de los MVBs aunque la mayor parte de PDPN se localiza en la membrana plasmática (PM).

## 5. Podoplanina se incorpora tanto a exosomas como a microvesículas

Las EVs son una población heterogéneas de vesículas compuesta principalmente por EXOs (de origen endosómico) y MVs (que se forman por gemación de la membrana plásmatica). El hecho de que PDPN sea una proteína transmembrana, sugería que podría estar siendo secretada asociada a ambos tipos de EVs. Para comprobarlo, se aislaron los dos tipos de EVs de la línea celular MDCK-PDPN mediante centrifugación diferencial del medio condicionado (véase la **Figura 7** en Materiales y métodos). Las MVs se aislaron por centrifugación a 10.000 x *g* mientras que para purificar los EXOs, la fracción de c-EXOs obtenida por ultracentrifugación a 100.000 x *g* se sometió a un gradiente de densidad en Optiprep™. Las fracciones del gradiente se analizaron mediante Western blot, seleccionando la fracción 8 por su alta expresión del

marcador exosómico Alix y PDPN (**Figura 19A**). Para este experimento, las células MDCK-PDPN se cultivaron en medio en presencia o ausencia de suero (deplecionado de EVs por centrifugación), durante 24 h. Como se observa en la **Figura 19B**, PDPN se incorpora tanto a MVs como a EXOs, y la presencia de suero no influye en la incorporación de PDPN a uno u otro tipo de EV. Es destacable que en EXOs se observe bandas de ~ 80 kDa (**Figura 19B, asterisco**) que corresponden a un homodímero de PDPN que se detecta en tejidos normales y tumorales ([Fernandez-Munoz et al. 2011](#)). La técnica de dispersión dinámica de la luz de las fracciones de EXOs aislada de células MDCK-PDPN y MDCK-CMV reveló una distribución homogénea de las muestras, con un tamaño de aproximadamente 85 y 90 nm, respectivamente (**Figura 19C**).

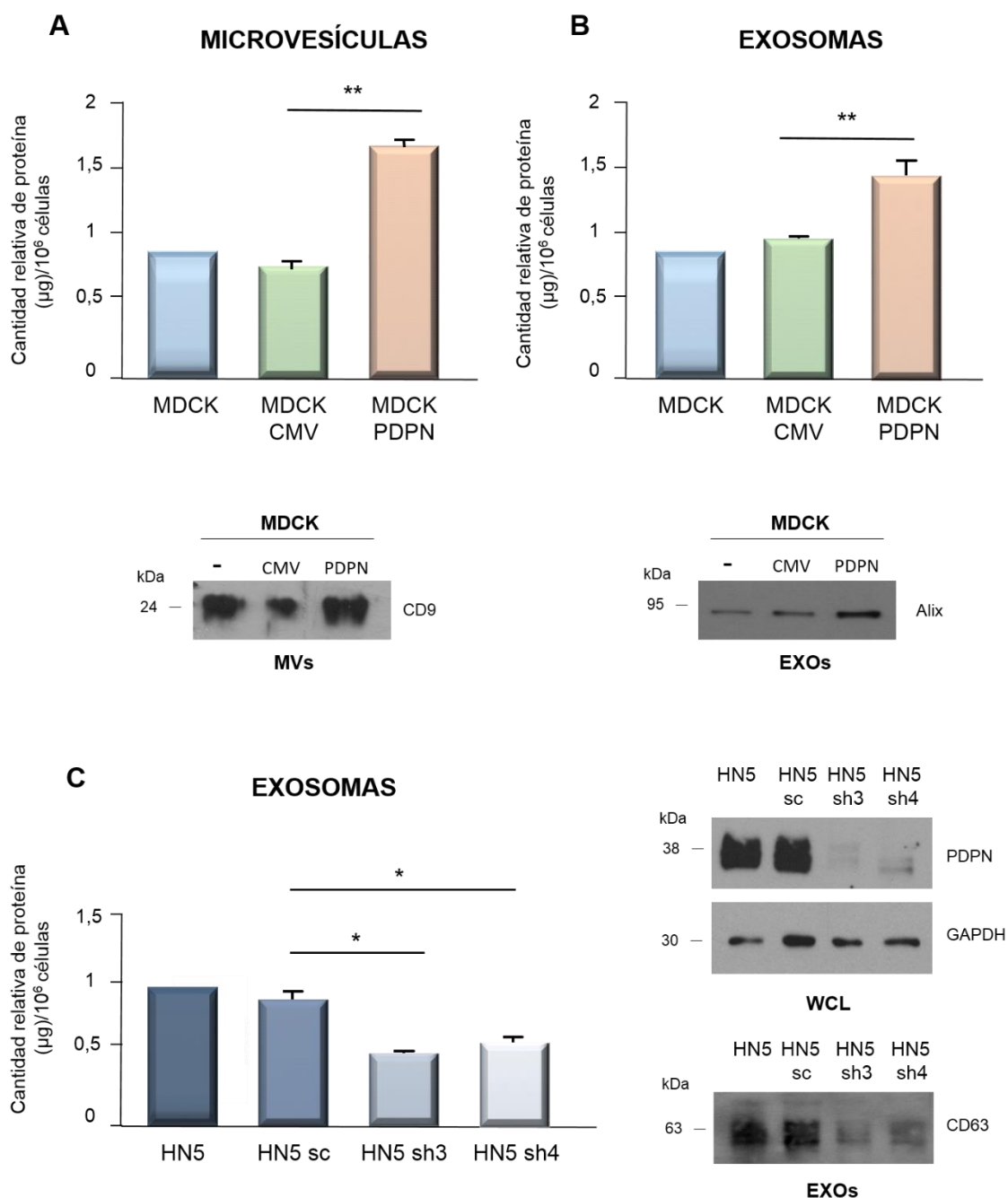


**Figura 19. Purificación de exosomas de células MDCK-PDPN y análisis de la expresión de podoplanina en microvesículas y exosomas.** (A) Se determinó la expresión del marcador exosómico Alix y de PDPN en las fracciones 6-9 obtenidas a partir de un gradiente de densidad OptiPrep™ de la fracción c-EXOs de células MDCK-PDPN. Se seleccionó la fracción 8 por su enriquecimiento en EXOs. (B) Análisis de la expresión de PDPN en MVs y EXOs aislados de células MDCK-PDPN condicionadas con medio en presencia o ausencia de suero (libre de EVs). WCL, lisado celular. \* Indica una banda de ~ 80 kDa que corresponde a un homodímero no covalente de PDPN identificado en tejidos. (C) Dispersión dinámica de la luz de EXOs aislados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN purificados a partir del gradiente de densidad OptiPrep™.

## 6. Podoplanina regula la producción de microvesículas y exosomas

En la actualidad, es ampliamente aceptada la idea de que la producción de EVs aumenta durante la progresión tumoral. Como la expresión de PDPN en MDCK va asociada con la adquisición de un fenotipo más agresivo, se cuantificó la cantidad de MVs y c-EXOs secretadas por el mismo número de células MDCK, MDCK-CMV y MDCK-PDPN cultivadas en medio condicionado en ausencia de suero durante 24 h. Como se puede observar en la **Figura 20A, B**, tanto en la línea parental MDCK como en la línea control MDCK-CMV, la cantidad de MVs y c-EXOs fue similar en ambas líneas celulares. Sin embargo, tanto la cantidad de MVs como de c-EXOs aislados de células MDCK-PDPN fue significativamente mayor (1.5 a 1.7 veces) respecto a las líneas anteriores. La cantidad de EVs medida por el contenido proteico de las vesículas correlacionaba con la expresión de marcadores Alix, específico de EXOs, y de CD9, que se expresa tanto en EXOs como MVs (**Figura 20A**). El modelo celular MDCK secreta ~ 10 veces más EXOs que MVs. La cantidad de MVs por  $10^6$  células varió entre ~ 0.25  $\mu$ g en células MDCK y MDCK-CMV y ~ 0.4  $\mu$ g en células MDCK-PDPN, mientras que la fracción c-EXOs varió entre ~ 2.8  $\mu$ g en células MDCK y MDCK-CMV y ~ 4.2  $\mu$ g en MDCK-PDPN. El mismo análisis se realizó en la línea celular HN5, en la que la expresión de PDPN se silenció mediante shRNAs ([Martin-Villar et al. 2010](#)). Se derivaron las líneas HN5-sh3 y -sh4 interferidas mediante dos shRNAs distintos, en las que se obtuvo una reducción del 90% para la expresión de PDPN, y la línea control (HN5-sc) interferida con una mezcla de shRNAs inespecíficos, en la que la expresión de PDPN era similar a la de la línea parental (**Figura 20C**). El silenciamiento de PDPN en las líneas celulares HN5-sh3 y -sh4 produjo una disminución significativa en la producción de EXOs (~ 2 veces) con respecto a las células control (HN5 y HN5-sc), que correlacionaba con una reducción en los niveles de expresión del marcador exosómico CD63 (**Figura 20C**). La cantidad de c-EXOs secretados por  $10^6$  células varió entre ~ 0.15  $\mu$ g en células HN5-sh3 y -sh4 frente a ~ 0.3  $\mu$ g en células HN5 y HN5-sc. La cantidad de MVs producidas por estas líneas celulares fue insignificante. Estos resultados sugieren que PDPN modula la biogénesis/secreción de EVs.





**Figura 20. Podoplanina estimula la producción de vesículas extracelulares. (A y B)** Cuantificación de MVs (A) y c-EXOs (B) aislados del mismo número de células ( $2 \times 10^7$ ) MDCK, MDCK-CMV y MDCK-PDPN. Se aislaron las MVs y c-EXOs tal como se indica en la Figura 7 y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS. Las vesículas se cuantificaron como se indica en Materiales y métodos. En la parte inferior se muestra la expresión de los marcadores CD9 y Alix en MVs y c-EXOs, respectivamente, mediante Western blot. Para cada carril se aplicó el mismo volumen (20  $\mu$ l) de MVs y c-EXOs. **(C)** Cuantificación de c-EXOs secretados por HN5 y líneas derivadas en las que la expresión de PDPN se silenció con shRNAs específicos (-sh3, -sh4) o un shRNA control (-sc). En el panel superior derecho se muestra la disminución de la expresión de PDPN en estas células mediante Western blot, usando GAPDH como control de carga, y, en la parte inferior, se muestra la expresión del marcador exosómico CD63. Para el Western blot del panel superior en cada carril se aplicó la misma cantidad de proteína (30  $\mu$ g) mientras que para el panel inferior se aplicó el mismo volumen (20  $\mu$ l) de c-EXOs en cada carril. Los resultados son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  S.E.M, \*\*  $P < 0,01$  (A, B); \*  $P < 0,05$  (C).

## 6.1 El silenciamiento de la expresión de podoplanina en células de carcinoma reduce su tumorigenicidad

Para comprobar el efecto del silenciamiento de PDPN en la tumorigenicidad de la línea celular HN5, se inyectaron el mismo número de células ( $2,5 \times 10^6$ ) HN5-sc, HN5-sh3 y HN5-sh4 en los dos flancos de ratones inmunodeficientes (nu/nu) y se observó la formación de tumores durante, al menos, 2 meses. Como puede verse en la **Tabla 4**, las células HN5 sc indujeron tumores en el 100% de los sitios de inyección, mientras que las células HN5-sh3 y -sh4 sólo en el 33% y el 17%, respectivamente. Estos datos sugieren que la expresión de PDPN promueve la capacidad tumorigénica de las células de carcinoma y confirma resultados anteriores de nuestro laboratorio ([Scholl et al. 2000](#)), así como resultados presentados más adelante en esta Tesis.

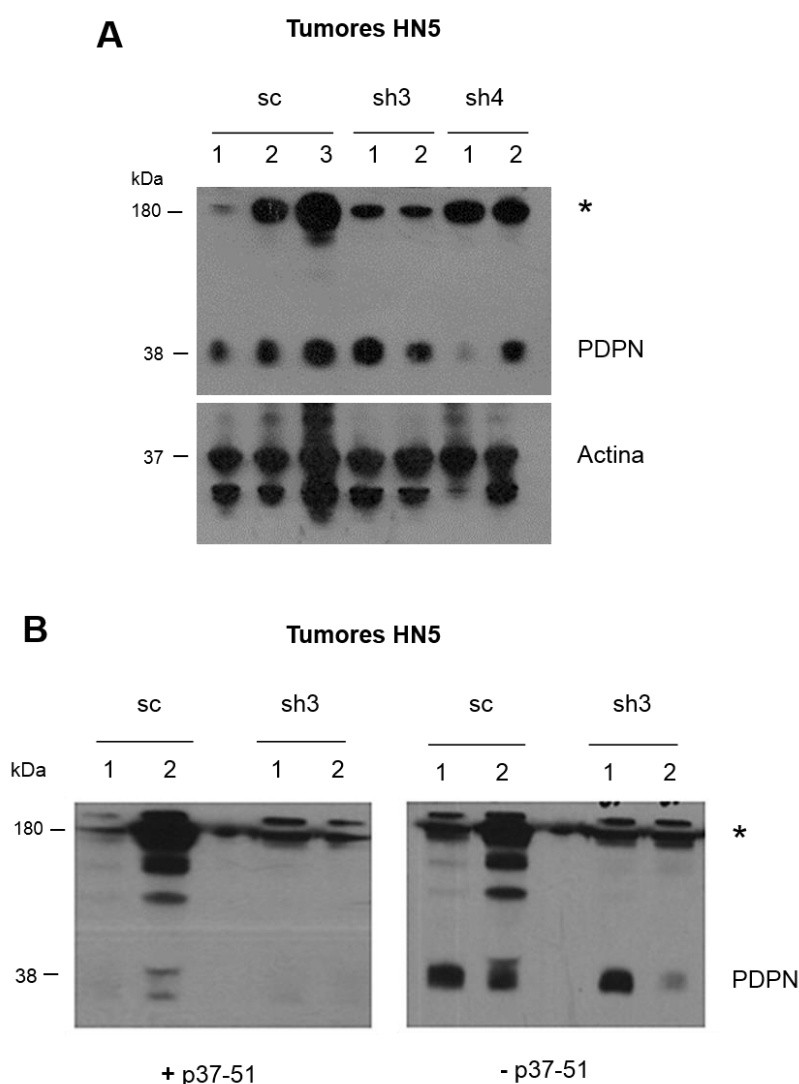
Se analizó también la expresión de PDPN en los tumores inducidos por las líneas celulares mediante Western blot. Como se observa en la **Figura 21A, B** se obtuvieron niveles variables de PDPN en los distintos tumores. No obstante, los niveles de PDPN en los tumores inducidos por HN5-sc, HN5-sh3 y HN5-sh4 fueron comparables, a pesar de que las células -sh3 y -sh4 tienen la expresión de PDPN disminuida un 90% con respecto a HN5 sc. Esta observación sugiere que en los tumores inducidos por -sh3 y -sh4 se seleccionan preferentemente células con una alta expresión de PDPN mientras que las células que expresan bajos niveles de PDPN son incapaces de formar tumores, como confirma el hecho de que el tumor inducido por HN5-sh4 señalado como n°1 en la **figura 21A**, que tiene el nivel más bajo de expresión de PDPN, es el que se quedó estancado en un tamaño  $<0.5 \text{ cm}^2$  (**Tabla 4**). Las bandas de gran tamaño reconocidas por el anticuerpo NZ1 marcadas con un asterisco son inespecíficas ya que no desaparecen cuando el anticuerpo se preincuba con el péptido (p37-51) del dominio EC de PDPN que se utilizó como inmunógeno, mientras que las bandas de 38 kDa (el tamaño de PDPN humana madura) desaparecieron tras la preincubación con el péptido (**Figura 21B**).

**Tabla 4.** Tumorigenicidad de HN5 y líneas celulares derivadas

LÍNEA CELULAR	N° DE TUMORES/ SITIOS DE INYECCIÓN	LATENCIA*
HN5 sc	6/6	4-8
HN5 sh3	2/6	6-7
HN5 sh4	1/6**	7

(\*) Tiempo necesario para que los tumores alcancen un tamaño de  $0.5 \text{ cm}^2$ .

(\*\*) Las células HN5 sh4 indujeron también un pequeño tumor que tras dos meses alcanzó un tamaño  $< 0.5 \text{ cm}^2$ . Este tumor no se incluye en la tabla.

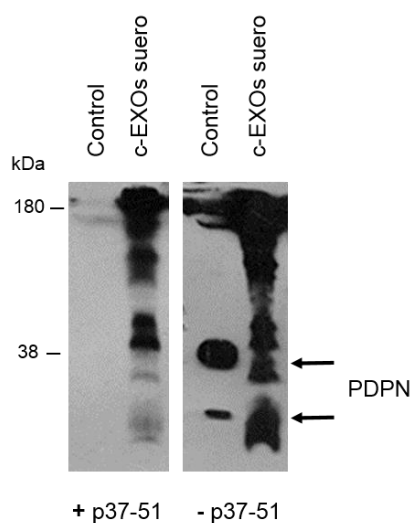


**Figura 21. Análisis por Western blot de la expresión de podoplanina en tumores inducidos por el sistema celular HN5. (A)** Western blot de lisados de los tumores inducidos por las líneas celulares indicadas con el anticuerpo anti-PDPN NZ1 y un anticuerpo anti-actina como control de carga. Cada carril corresponde a un tumor distinto. **(B)** El anticuerpo NZ1 se preincubó con el péptido inmunógeno p37-51 para demostrar que las bandas de mayor tamaño (señaladas con un asterisco) son inespecíficas.

## 6.2 Podoplanina es secretada *in vivo* asociada a exosomas

Para estudiar si PDPN estaba siendo secretada *in vivo* asociada a EVs, aislamos la fracción c-EXOs del suero de ratones con tumores inducidos por la línea celular HN5-sc mediante centrifugación diferencial. Para analizar la presencia de PDPN en esta fracción mediante Western blot, se utilizó un anticuerpo dirigido contra el dominio EC de PDPN (NZ1), antes y después de preincubar con el péptido inmunógeno P37-51, para confirmar la especificidad de las bandas. Como se observa en la **Figura 22**, se detectó la presencia de bandas específicas de PDPN correspondientes a la forma madura

plenamente glicosilada y formas menos glicosiladas en la fracción c-EXOs aislada del suero (**flechas**).



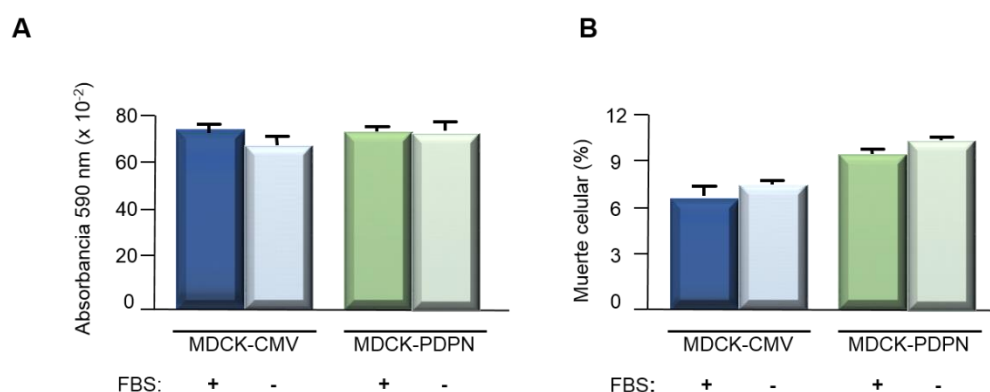
**Figura 22. Análisis por Western blot de la presencia de podoplanina en vesículas secretadas *in vivo*.** Se detectó la presencia de PDPN (flechas) en vesículas aisladas del suero de 3 ratones inoculados con la línea celular HN5-sc. Debido al alto contenido proteico del suero, se preincubó el anticuerpo NZ1 con el péptido inmunógeno (p37-51) para identificar las bandas inespecíficas. En el carril Control se aplicó un extracto de células HN5.

## PARTE II. ESTUDIOS PROTEÓMICOS DEL CONTENIDO DE EXOSOMAS

### 1. Análisis proteómico de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN

A continuación comparamos el perfil proteómico, tanto de células como de c-EXOs derivados de MDCK-CMV y MDCK-PDPN, con el fin de obtener información clave en los cambios celulares que ocurren como consecuencia de la expresión de PDPN. Para ello, las líneas celulares se condicionaron 24 h en medio de cultivo en ausencia de suero, para evitar contaminaciones de proteínas séricas. El cultivo en ausencia de suero durante 24 h no afectó de forma significativa ni a la proliferación ni a la viabilidad celular (**Figura 23**).

El análisis proteómico identificó 835 proteínas comunes para MDCK-CMV y MDCK-PDPN, mientras que se detectaron 97 y 84 proteínas específicas de células MDCK-PDPN y MDCK-CMV, respectivamente (**Figura 24A**). En la **Tabla 5** se muestra un listado de las proteínas enriquecidas en células MDCK-PDPN con respecto a MDCK-CMV. Estas están involucradas en la dinámica de actina y en adhesiones focales (PLS3, EHD2, EPS8, FERMT2), en la remodelación de la ECM (PLOD2, SERPINE1, COLIA2), en el tráfico intracelular y la translocación de proteínas (EHD2, KTN1, EPS8, SCFD1, PTPN1, SSR1), en la transducción de señales (GNAS y CD109) y en el metabolismo (HADHB, GLS, CYP51A1, PTPN1). También se identificaron proteínas cuya expresión disminuía en células MDCK-PDPN (**Tabla 6**). Entre ellas encontramos proteínas de adhesión celular, componentes del citoesqueleto y proteínas de remodelación de la ECM (KRT7, TES, JUP, EPCAM, CTNNB1, TGM2, SERPINB5), así como proteínas implicadas en el control del tráfico vesicular y del transporte de proteínas (ANXA6, AP1B1, LLGL2, RAB8A, COPG2 y TOMM40), en la transducción de señales (CTNNB1 y SPTBN1), en el metabolismo (PLA2G7, IDH, TSTA3, ACY1), en la síntesis de proteínas (EIF4A2 y EIF4G1), en el procesamiento de ARNs (DDX47, ESRP1) y reguladores de la ubiquitinación de proteínas (ISG15 y TRIM28).



**Figura 23.** La ausencia de suero no afecta a la proliferación o viabilidad de las células. Las células MDCK-CMV y MDCK-PDPN se cultivaron en presencia o ausencia de FBS (10%) durante 24 h. El crecimiento **(A)** y la viabilidad celular **(B)** se determinaron por el ensayo de MTT y tinción por exclusión con azul tripán, respectivamente.

**Tabla 5.** Proteínas enriquecidas más de 5 veces en células MDCK-PDPN vs MDCK-CMV

NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	FUNCIÓN <sup>a</sup>	RATIO DE CUENTAS ESPECTRALES (Rsc) <sup>b</sup>
PLS3	PLASTIN 3 (FIMBRIN)	AD	28.6
EHD2	EPS15 HOMOLOGUE DOMAIN CONTAINING 2	AD, IT	9.5
KTN1	KINECTIN 1	FA	8.6
PLOD2	PROCOLLAGEN LYSYL HYDROXYLASE 2	ECM	8.6
HADHB	HYDROXYACYL-COENZYME A DEHYDROGENASE	M	7.1
GNAS	$\alpha$ SUBUNIT OF THE STIMULATORY G PROTEIN	ST	7.1
EPS8	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR KINASE SUBSTRATE 8	AD, IT	6.3
SERPINE1	PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1	ECM	6.3
COL1A2	TYPE I COLLAGEN, $\alpha_2$ CHAIN	ECM	6.3
KNG1	KININOGEN 1	MF	6.3
GLS	GLUTAMINASE	M	5.6
SCFD1	SEC1 FAMILY DOMAIN CONTAINING 1	IT	5.6
CYP51A1	CYTOCHROME P450, FAMILY 51, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1	M	5.6
PTPN1	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE NON-RECEPTOR TYPE 1 (PTP1B)	ST, IT, M	5.6
SSR1	SIGNAL SEQUENCE RECEPTOR $\alpha_1$ /TRANSLOCATOR-ASSOCIATED PROTEIN SUBUNIT $\alpha$ (TRAP- $\alpha$ )	PT	5.6
FERMT2	FERMITIN FAMILY MEMBER 2/KINDLIN	FA	5.6
CD109	CD109	ST	5.6

<sup>a</sup> AD, dinámica de actina; TI, tráfico intracelular; ECM, remodelación de la matriz extracelular; M, metabolismo; ST, transducción de señales; PT, translocación de proteínas; FA, adhesiones focales; MF, multifuncional.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el aumento en la expresión de proteínas en MDCK-PDPN con respecto a la línea control MDCK-CMV.

## 2. Análisis proteómico de exosomas aislados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN

Los perfiles proteicos de EXOs purificados de las células MDCK-CMV y MDCK-PDPN, como se muestra en la **Figura 24A**, revelaron 233 proteínas en común, aunque se observó un enriquecimiento de proteínas específicas en EXOs derivados de MDCK-PDPN (221) respecto a EXOs control de MDCK-CMV (61). Utilizando el programa GENE-E se agruparon las proteínas según su expresión diferencial: en rojo las que aumentan en EXOs-PDPN respecto a EXOs-CMV control, y en azul las que disminuyen

(Figura 24B). En la misma figura, se muestran las 10 proteínas más enriquecidas en EXOs-PDPN. La mayoría de ellas actúan en el tráfico de vesículas (EHD2, ANXA8L1, MYO1C, FLOT1, RAP1B, RAB14). De hecho, un gran número de proteínas enriquecidas en EXOs-PDPN están implicadas en el control de la endocitosis y el tráfico de vesículas (Tabla 7): proteínas de las familias RAB, RAL y RAP de GTPasas pequeñas (RAB14, RAB1B, RAB13, RAB8B, RAB21, RAB35, RAB2A, RAB7A, RAB6A, RALA, RALB y RAP2B), anexinas (ANXA8L1, ANXA4, ANXA7 y ANXA5), tetraspaninas (CD151, CD82 y TSPAN9), componentes de los complejos ESCRT (TSG101 y IST1) y SNARE (STX7y STXB3) involucradas en la biogénesis de EXOs y proteínas implicadas en la formación de balsa lipídicas (FLOT1, FLOT2, ZDHHC5), entre otras. La expresión de la mayoría de estas proteínas no cambia significativamente en células MDCK tras la expresión de PDPN, con la excepción de EHD2, CD82 y ANXA5, que también aumentan en MDCK-PDPN respecto a MDCK-CMV.

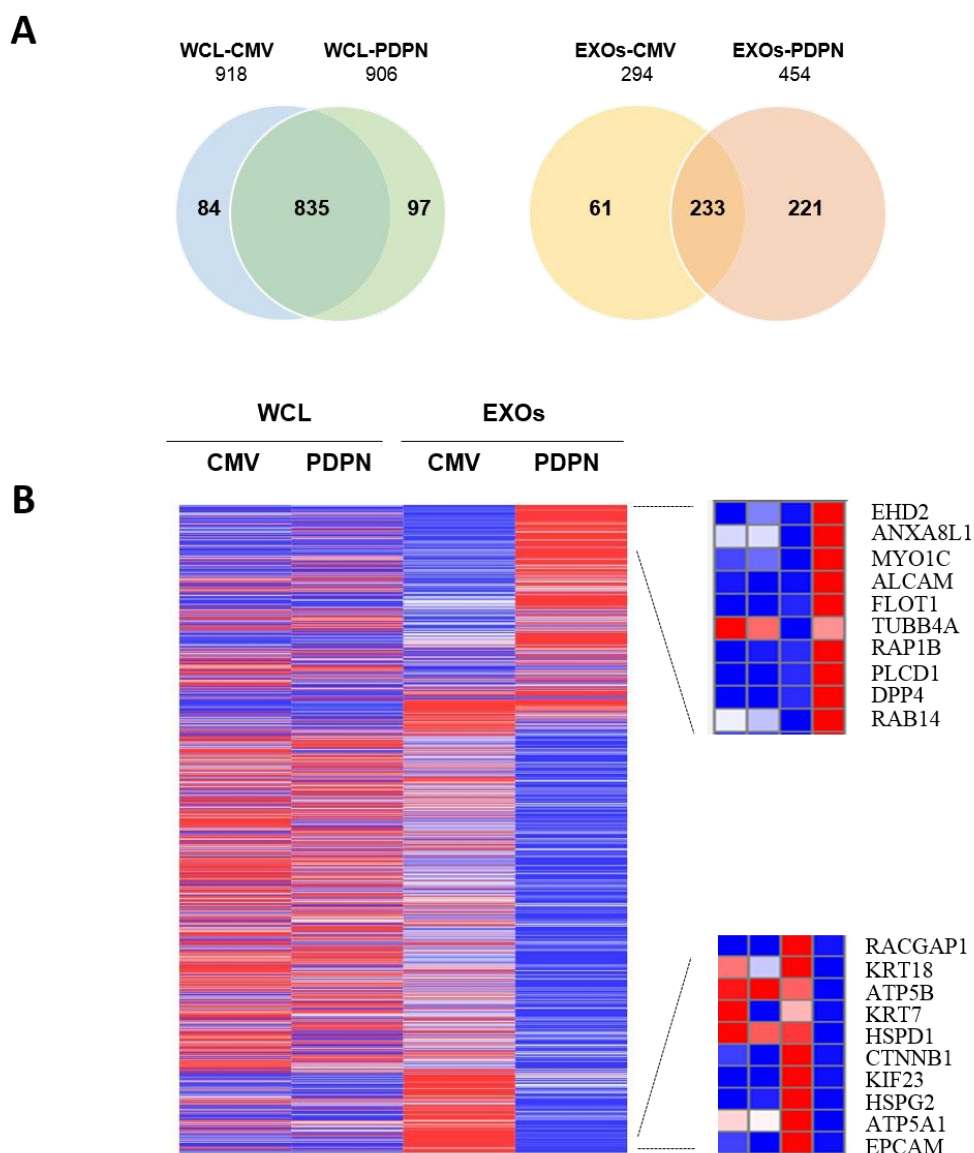
**Tabla 6.** Proteínas que disminuyen su expresión más de 5 veces en MDCK-PDPN vs MDCK-CMV

NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	FUNCIÓN <sup>a</sup>	RATIO DE CUENTAS ESPECTRALES (Rsc) <sup>b</sup>
KRT7	KERATIN 7	CK	-58.3
JUP	PLAKOGLOBIN	CA	-23.7
EIF4A2	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4A2	PS	-20.3
ANXA6	ANNEXIN A6	IT	-11.9
SPTBN1	βII-SPECTRIN	ST	-10.4
TGM2	TRANSGLUTAMINASE 2	ECM	-10.3
AP1B1	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1	EP, IT	-9.4
DSP	DESMOPLAKIN	CA	-9.4
EPCAM	EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE	CA	-7.7
ISG15	INTERFERON-STIMULATED GENE 15	UP	-7.7
LLGL2	LETHAL GIANT LARVAE HOMOLOG 2	EP, IT	-6.9
DDX47	DEAD-BOX POLYPEPTIDE 47	RNA	-6.9
RAB8A	RAB8A	IT	-6.9
PLA2G7	PHOSPHOLIPASE A2, GROUP 7	M	-6.9
CTNNB1	β-CATENIN	CA, ST	-6.1
IDH	ISOCITRATE DEHYDROGENASE	M	-6.1
ESRP1	EPITHELIAL SPLICING REGULATORY PROTEIN 1	RNA	-6.1
EML4	ECHINODERM MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 1	CK	-6.1
TES	TESTIN	AD, CK	-6.1
COPG2	COATOMER PROTEIN COMPLEX γ2	IT	-6.1
KRT14	KERATIN 14	CK	-5.7
EIF4G1	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4γ1	PS	-5.2
TSTA3	TISSUE SPECIFIC TRANSPLANTATION ANTIGEN P53B	M	-5.2
SERPINB5	MASPIN	ECM	-5.2
ACY1	AMINOACYLASE 1	M	-5.2
TRIM28	TRIPARTITE MOTIF CONTAINING PROTEIN 28	UP	-5.2
BAG6	BCL2-ASSOCIATED ATHANOGEN 6	MF	-5.2
TOMM40	TRANSLOCASE OF THE OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE, 40KDA	PT	-5.2
PFAS	PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHETASE	M	-5.2

<sup>a</sup> AD, dinámica de actina; CK, remodelación del citoesqueleto; TI, tráfico intracelular; ECM, remodelación de la matriz extracelular; M, metabolismo; ST, transducción de señales; PT, translocación de proteínas; CA, adhesión celular; EP, polaridad epitelial; UP, vía ubiquitina; ARN, metabolismo del ARN; MF, multifuncional.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el grado de carestía de la proteína en MDCK-PDPN con respecto a la línea control MDCK-CMV.

Curiosamente, la expresión de ANXA7 disminuyó alrededor de 4 veces en células MDCK-PDPN y, sin embargo, aumentó en la misma proporción en EXOs-PDPN (**Tabla 7**). Estos resultados sugieren que la expresión de PDPN en células MDCK promueve la incorporación de estas proteínas en ILVs, facilitando así la producción de EXOs (**véase la Figura 20B**)



**Figura 24. Análisis proteómico de exosomas. (A)** Diagrama de Venn de proteínas comunes y específicas identificadas en células (WCL, whole cell lysate) y EXOs de MDCK-CMV y MDCK-PDPN. **(B)** Las proteínas se representan en un “heatmap”, en el cual el aumento y disminución en la expresión de proteínas en EXOs-PDPN con respecto a EXOs-CMV control se indica en rojo y azul, respectivamente. En la lista se muestran las 10 proteínas más representativas que aumentan (arriba) y disminuyen (abajo).



Otras proteínas enriquecidas en EXOs-PDPN están implicadas en la adhesión celular (integrinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas) y en la remodelación del citoesqueleto (tubulinas, proteínas motoras de la familia de las miosinas y quinesinas, y proteínas de unión a actina), tal como se indica en la **Tabla 8**, así como en vías de transducción de señales (**Tabla 9**), en particular miembros de las vías de semaforinas y efrinas.

También se identificaron proteínas que reducen su expresión en EXOs-PDPN con respecto a EXOs control (**Figura 24B**, panel inferior derecho). De ellas cabe destacar, las ATP sintasas mitocondriales ATP5A1 y ATP5B, la chaperona HSPD1, el componente de la ECM perlecan (HSPG2), la proteína motora de tipo quinesina KIF23/MKLP1, la proteína activadora de la actividad GTPasa de Rac RACGAP1, así como proteínas del citoesqueleto y de la adhesión celular (EPCAM, CTNNB1, KRT7, KRT18).

**Tabla 7.** Proteínas implicadas en endocitosis y tráfico de vesículas enriquecidas en EXOs-PDPN vs EXOs-CMV

CATEGORIA/ FUNCIÓN	NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	Rsc EXOS <sup>a</sup>	Rsc WCL <sup>b</sup>
GTPasas PEQUEÑAS	RAB14	RAB14	7.9	-1.2
	RAB1B	RAB1B	6.8	-1.0
	RAB13	RAB13	5.8	-1.0
	RAB8B	RAB8B	4.8	-1.0
	RAB21	RAB21	4.8	-1.7
	RAB35	RAB35	4.3	-1.0
	RAB2A	RAB2A	3.6	1.0
	RAB7A	RAB7A	2.9	1.3
	RAB6A	RAB6A	2.9	-1.5
	RALA	RALA	6.8	-1.0
	RALB	RALB	4.3	-1.0
	RAP1B	RAP1B	8.4	2.5
	RAP2B	RAP2B	4.8	1.4
ANEXINAS	ANXA8L1	ANNEXIN A8-LIKE 1	13.6	1.0
	ANXA4	ANNEXIN A4	5.8	1.1
	ANXA7	ANNEXIN A7	5.5	-4.4
	ANXA5	ANNEXIN A5	3.8	2.6
TETRASPANINAS	CD151	CD151 TETRASPANIN	4.3	-1.0
	CD82	CD82 TETRASPANIN	7.9	4.0
	TSPAN9	TETRASPANIN 9	5.3	3.3
ESCRT <sup>c</sup>	TSG101	TUMOR SUSCEPTIBILITY 101	2.7	-1.4
	IST1	INCREASED SODIUM TOLERANCE 1 HOMOLOG	3.2	-1.0
SNARE <sup>c</sup>	STX7	SYNTAXIN 7	3.2	-1.0
	STXB3	SYNTAXIN BINDING PROTEIN 3	2.7	-1.0
FORMACIÓN DE BALSAS LIPÍDICAS	FLOT 1	FLOTILLIN 1	10.0	-1.0
	FLOT2	FLOTILLIN 2	6.3	-1.0
	ZDHHC5	ZINC FINGER, DHHC-TYPE CONTAINING 5	3.7	-1.0
OTROS	EHD2	EH-DOMAIN CONTAINING 2	17.8	9.5
	VAT1	VESICLE AMINE TRANSPORT 1	7.9	-1.0
	VPS35	VACUOLAR PROTEIN SORTIN 35 HOMOLOG	4.3	1.0
	AP2A2	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 2, $\alpha 2$ SUBUNIT	3.2	1.1

<sup>a</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el aumento de la expresión de la proteína en EXOs-PDPN respecto a EXOs-CMV.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica la expresión diferencial de proteínas entre las líneas MDCK-PDPN y MDCK-CMV. Valores positivos o negativos de Rsc reflejan un aumento o una disminución de la expresión en células MDCK-PDPN.

<sup>c</sup> ESCRT, complejo de distribución endosomal requerido para el transporte; SNARE, receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible N-etilmaleimida.

Los EXOs aislados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN mostraron el mismo patrón de cambios asociados con la EMT: disminución de la expresión de marcadores epiteliales, tales como EPCAM, cadherina E (CDH1), cateninas (CTNNA1, CTNNB1), claudina 4 (CLDN4), desmogleína 3 (DSG3) y queratinas (KRT7, KRT19, KRT18, KRT8) (**Tabla 10**) y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimáticos, tales como cadherina N (**Figura 25A**). La única excepción fue la queratina 14 (KRT14) que está enriquecida ~ 5 veces en EXOs-PDPN mientras que su expresión disminuye ~ 6 veces en células MDCK-PDPN (**Tabla 8**). Desconocemos el significado biológico de esta observación.

**Tabla 8.** Proteínas de adhesión celular y remodelación del citoesqueleto enriquecidas en EXOs-PDPN vs EXOs-CMV

CATEGORIA/ FUNCIÓN	NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	Rsc EXOS <sup>a</sup>	Rsc WCL <sup>b</sup>
FAMILIA DE INTEGRINAS	ITGa5	INTEGRIN A5	7.9	3.3
	ITGa6	INTEGRIN A6	2.8	-1.5
	ITGaV	INTEGRIN AV	2.6	-1.1
FAMILIA DE GALECTINAS	LGALS3BP	LECTIN GALACTOSIDE –BINDING SOLUBLE 3 BINDING PROTEIN	5.2	-1.4
ADHESIÓN FOCAL	TLN1	TALIN 1	2.6	2.3
SUPERFAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS	ALCAM	ACTIVATED LEUKOCYTE CELL ADHESION MOLECULE (CD166)	11.0	-1.7
	IGSF8	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY MEMBER 8	5.8	-1.0
	PVR	POLIOVIRUS RECEPTOR	3.7	-1.0
PROTEINAS MOTORAS	MYO1C	MYOSIN 1C	12.2	1.3
	MYO1B	MYOSIN 1B	7.9	4.0
	KIF5B	KINESIN FAMILY MEMBER 5B	2.7	2.5
	ACTR1A	ARP1 ACTIN-RELATED PROTEIN 1 HOMOLOG A (	2.7	1.3
TUBULINAS	TUBB4A	TUBULIN B 4A	8.4	-1.2
	TUBA4A	TUBULIN A 4A	5.8	-1.1
PROTEINAS CAP F-ACTINA	CAPG	CAPPING PROTEIN GELSOLIN-LIKE	6.3	1.0
	CAPZA1	CAPPING PROTEIN MUSCLE Z-LINE ALPHA 1	3.7	-1.0
REMODELACIÓN DE LA ACTINA	ARPC3	ACTIN RELATED PROTEIN 2/3 COMPLEX, SUBUNIT 3	2.7	1.1
	NCKAP1	NCK-ASSOCIATED PROTEIN 1	5.8	-2.0
	SEPT6	SEPTIN 6	2.7	1.2
PROTEINAS ASOCIADAS A IF	KRT14	KERATIN 14	5.3	-5.7
	HRNR	HORNERIN (FILAGGRIN FAMILY MEMBER 3)	2.5	2.7

<sup>a</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el aumento de la expresión de la proteína en EXOs-PDPN respecto a EXOs-CMV.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica la expresión diferencial de proteínas entre las líneas MDCK-PDPN y MDCK-CMV. Valores positivos o negativos de Rsc reflejan un aumento o una disminución de la expresión en células MDCK-PDPN.

**Tabla 9.** Componentes de vías de señalización enriquecidos en EXOs-PDPN vs EXOs-CMV

CATEGORIA/ FUNCIÓN	NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	Rsc EXOS <sup>a</sup>	Rsc WCL <sup>b</sup>
SEMAFORINAS	PLXNB2	PLEXIN B2	6.3	-2.7
	NRP2	NEUROPILIN 2	2.7	-1.0
	DPYSL2	DIHYDROPIRIMIDINASE-LIKE 2	3.7	1.1
	DPYSL3	DIHYDROPIRIMIDINASE-LIKE 3	5.8	2.0
	RRAS	RELATED RAS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG	3.5	1.2
EFRINAS	EPHB2	EPHRIN RECEPTOR B2	3.2	-1.0
	EFNB1	EPHRIN-B1	2.7	-1.1
SRC/SFK <sup>c</sup>	PTPRA	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE $\alpha$	6.3	-2.7
	CDCP1	CUB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 1	3.2	-1.0
PROTEINAS G	GNA12	GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN $\alpha$ 12	5.0	-1.2
	GNAQ	GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN Q	3.2	-1.0
WNT	PTK7	PROTEIN TYROSINE KINASE 7	3.7	2.5
	CKAP4	CYTOSKELETON-ASSOCIATED PROTEIN 4	3.2	2.6
	TPB6	TROPHOBLAST GLYCOPROTEIN	2.7	-1.0
FOSFOINOSÍTIDO	PLCD1	PHOSPHOLIPASE C, $\delta$ 1	8.4	-1.0
	PI4KA	PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-KINASE $\alpha$	3.2	-1.0
MAPK <sup>c</sup>	MAP4K4	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 4	6.8	-1.0
TGF- $\beta$	CD109	CD109	2.7	5.6
MULTIPLES	YWHAH	TYROSINE 3-MONOOXIGENASE (14-3-3 $\eta$ )	2.7	1.3

<sup>a</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el aumento de la expresión de la proteína en EXOs-PDPN respecto a EXOs-CMV.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica la expresión diferencial de proteínas entre las líneas MDCK-PDPN y MDCK-CMV. Valores positivos o negativos de Rsc reflejan un aumento o una disminución de la expresión en células MDCK-PDPN.

<sup>c</sup> SRC/SFK, familia Src de proteínas tirosina quinasas; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos.

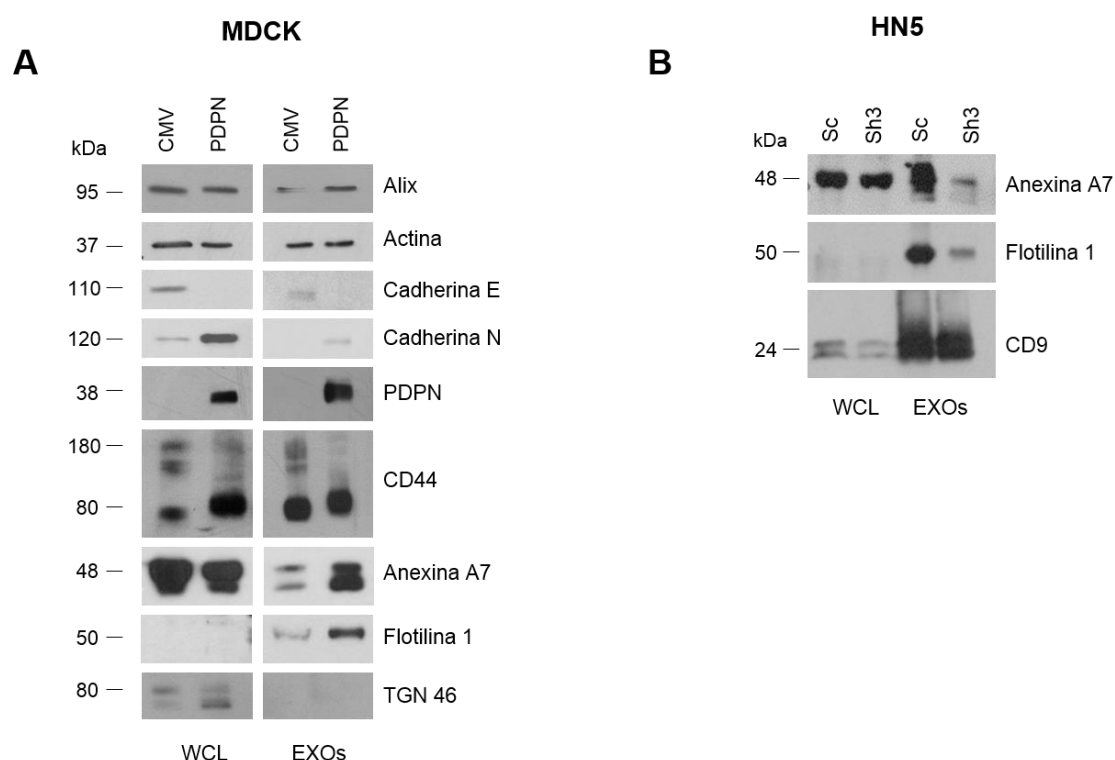
**Tabla 10.** Marcadores epiteliales cuya expresión disminuye en EXOs-PDPN vs EXOs-CMV

NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	Rsc EXOS <sup>a</sup>	Rsc WCL <sup>b</sup>
EPCAM	EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE	-22.8	-7.7
CDH1	CADHERIN 1	-6.5	-3.6
CTNNA1	CATENIN $\alpha$ 1	-3.1	-3.8
CTNNB1	CATENIN $\beta$ 1	-17.8	-6.1
KRT7	KERATIN-7	-16.5	-58.3
KRT19	KERATIN-19	-3.8	-12.7
KRT18	KERATIN-19	-14.1	-1.8
KRT8	KERATIN-8	-5.7	-2.6
MUC1	MUCIN 1	-6.5	-1.0

<sup>a</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el grado de carestía de la proteína en EXOs-PDPN respecto a EXOs-CMV.

<sup>b</sup> Rsc (ratio de cuentas espectrales) indica el grado de carestía de la proteína en células MDCK-PDPN respecto a células control MDCK-CMV.

Los EXOs purificados de MDCK-CMV y MDCK-PDPN contenían actina y los marcadores canónicos Alix y CD44; sin embargo, fueron negativos para el marcador del aparato de Golgi TGN46 (**Figura 25A**), confirmando la pureza de las preparaciones EXOs utilizadas en el análisis proteómico. Algunos de los cambios identificados mediante este análisis se validaron mediante Western blot, tanto en el modelo celular MDCK como en el HN5. Así, la expresión de anexina A7 aumentó en EXOs de MDCK-PDPN vs EXOs de MDCK-CMV, mientras que disminuyó en las células enteras (**Figura 25A**), confirmando los datos de la **Tabla 7**. Lo mismo ocurre con la expresión de flotilina 1 que aumentó en EXOs-PDPN mientras que en células enteras fue indetectable. Tanto la expresión de anexina A7 y flotilina 1 disminuyeron en EXOs de HN5-sh3, que tienen silenciada la expresión de PDPN, respecto a EXOs de HN5-sc control (**Figura 25B**), lo que sugiere un papel determinante de PDPN en la incorporación de estas proteínas a EXOs. Los niveles de Alix y CD9 no cambiaron significativamente en EXOs.



**Figura 25. Comparación de la expresión de proteínas en células enteras y EXOs de los modelos celulares MDCK (A) y HN5 (B) mediante Western blot. (A)** La expresión de cadherina E disminuyó mientras que la de cadherina N aumentó en células MDCK-PDPN y EXOs. Anexina A7 y flotilina 1 aumentaron en EXOs de MDCK-PDPN. Tanto estos como los EXOs control contenían actina y CD44, pero no el marcador del aparato de Golgi TGN46. **(B)** Los niveles de anexina A7 y flotilina 1 disminuyen en EXOs aislados de HN5-sh3 mientras que los niveles de CD9 no cambian significativamente.

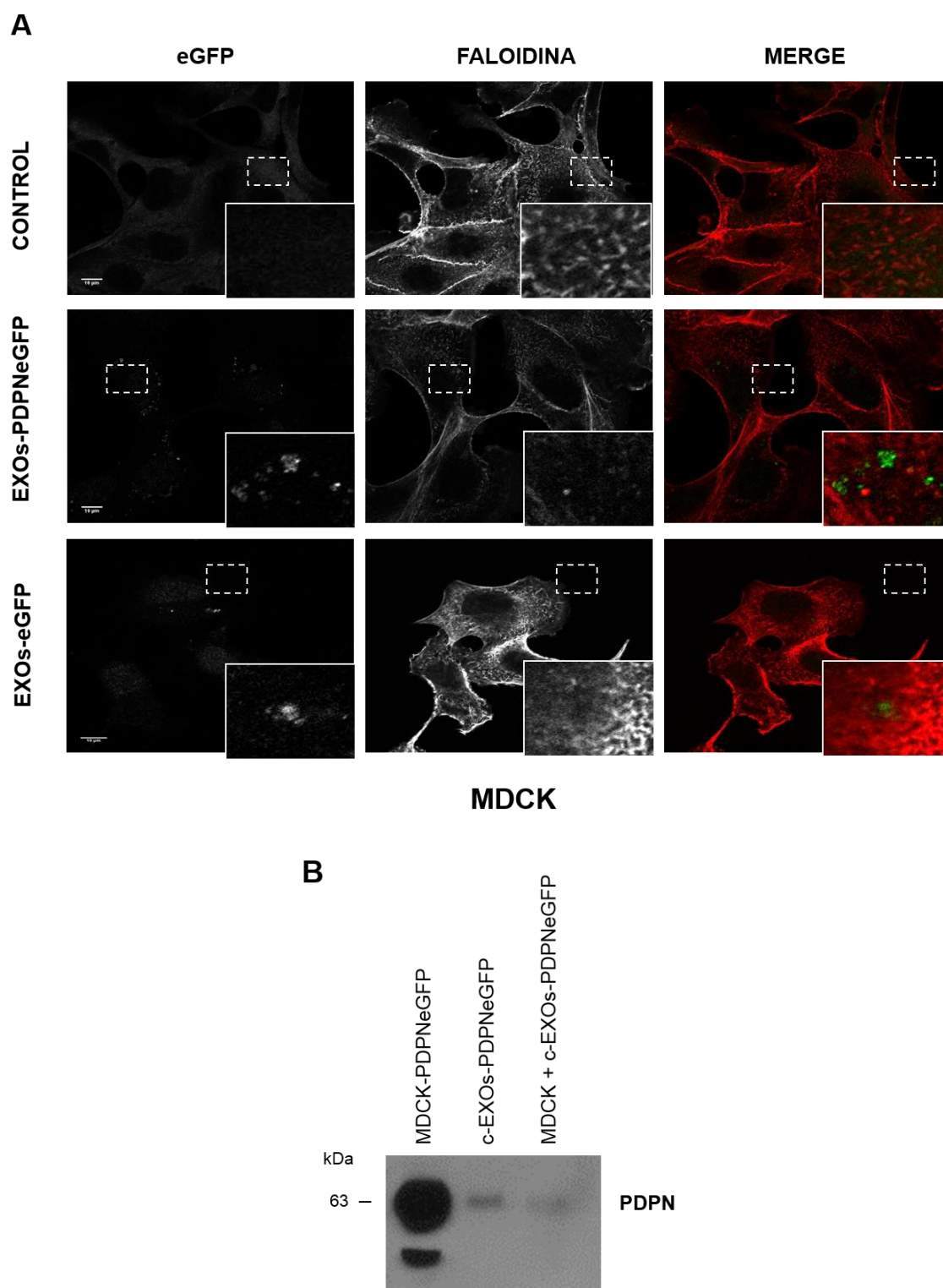
### PARTE III. RELEVANCIA BIOLÓGICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES QUE CONTIENEN PODOPLANINA

#### 1. Captación de exosomas por células MDCK

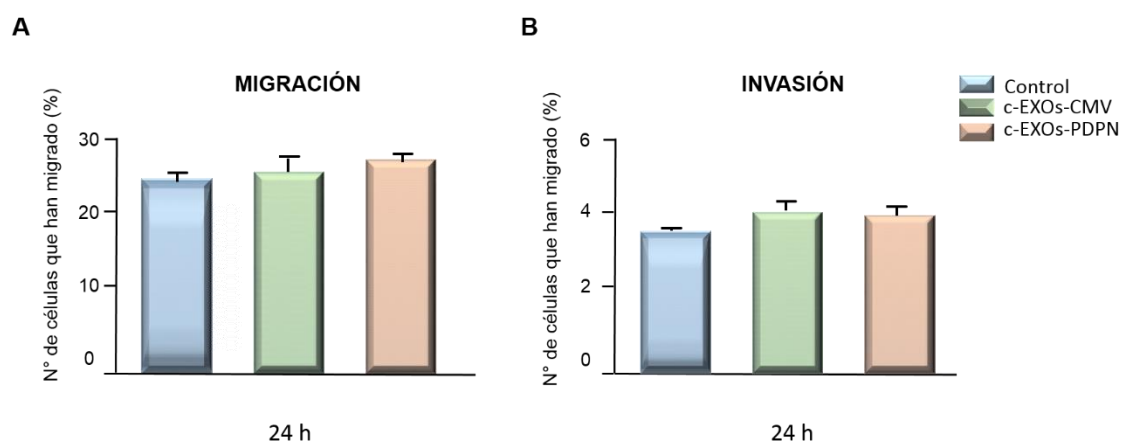
Distintos trabajos han mostrado que los EXOs pueden ser captados e internalizados por células diana. Nosotros quisimos comprobar si los EXOs secretados por células MDCK-eGFP y MDCK-PDPNeGFP eran captados e internalizados por células MDCK. Para ello, las células se incubaron con la fracción c-EXOs-eGFP y c-EXOs-PDPNeGFP durante 16 h y, a continuación, se analizó la captación de las vesículas por las células con un anticuerpo anti-GFP. El interior de las células se visualizó mediante faloidina, que tiñe los filamentos de actina. Como se observa en la **Figura 26A**, se detectaron vesículas en el interior celular indicando que los EXOs eran captados por las células. Además, se detectó PDPN en los extractos de células MDCK incubadas con EXOs-PDPNeGFP mediante Western blot. La presencia de la proteína en el interior de las células puede deberse tanto a la captación de la proteína transportada en la membrana de las vesículas como a la traducción del mRNA de PDPN que viaja en el interior de las vesículas.

#### 2. Efecto de exosomas-podoplanina en la migración/invasión de las células MDCK

Una vez comprobado que los EXOs eran captados e internalizados por células MDCK, analizamos el efecto de las vesículas en su capacidad migratoria e invasiva. Para estos experimentos las células MDCK se sembraron en pocillos de cámaras Transwell recubiertos o no con Matrigel a los que se añadieron 40 µg/ml de c-EXOs-CMV, c-EXOs-PDPN o el mismo volumen de PBS, como control. Tras 24 h, la capacidad migratoria e invasiva de las células control y tratadas con c-EXOs-CMV y -PDPN fue similar (**Figura 27**).



**Figura 26. Captación de exosomas por células MDCK. (A)** Las células MDCK se trataron con 40  $\mu\text{g/ml}$  de c-EXOs-eGFP y c-EXOs-PDPNeGFP durante 16 h. Tras la incubación, las células se fijaron y se analizó la localización de las vesículas marcadas con eGFP mediante microscopia confocal. Para visualizar el interior de la célula, se marcó el citoesqueleto de actina con faloidina conjugada con Alexa 546. Las imágenes muestran un plano de corte longitudinal intermedio indicando que las vesículas marcadas se localizan en el interior de la célula **(B)** Análisis de la expresión de PDPN en lisados de células MDCK-PDPNeGFP, c-EXOs aislados de estas células (c-EXOs-PDPNeGFP) y células MDCK incubadas durante 16 h con c-EXOs-PDPNeGFP mediante Western blot.



**Figura 27. Efecto de los exosomas en la migración e invasión de células MDCK.** Ensayos de migración en cámaras Transwell recubiertos **(B)** o no **(A)** con Matrigel de células MDCK incubadas durante 24 h con 40  $\mu\text{g/ml}$  de c-EXOs aislados de las líneas celulares MDCK-CMV y MDCK-PDPN o con el mismo volumen de PBS.

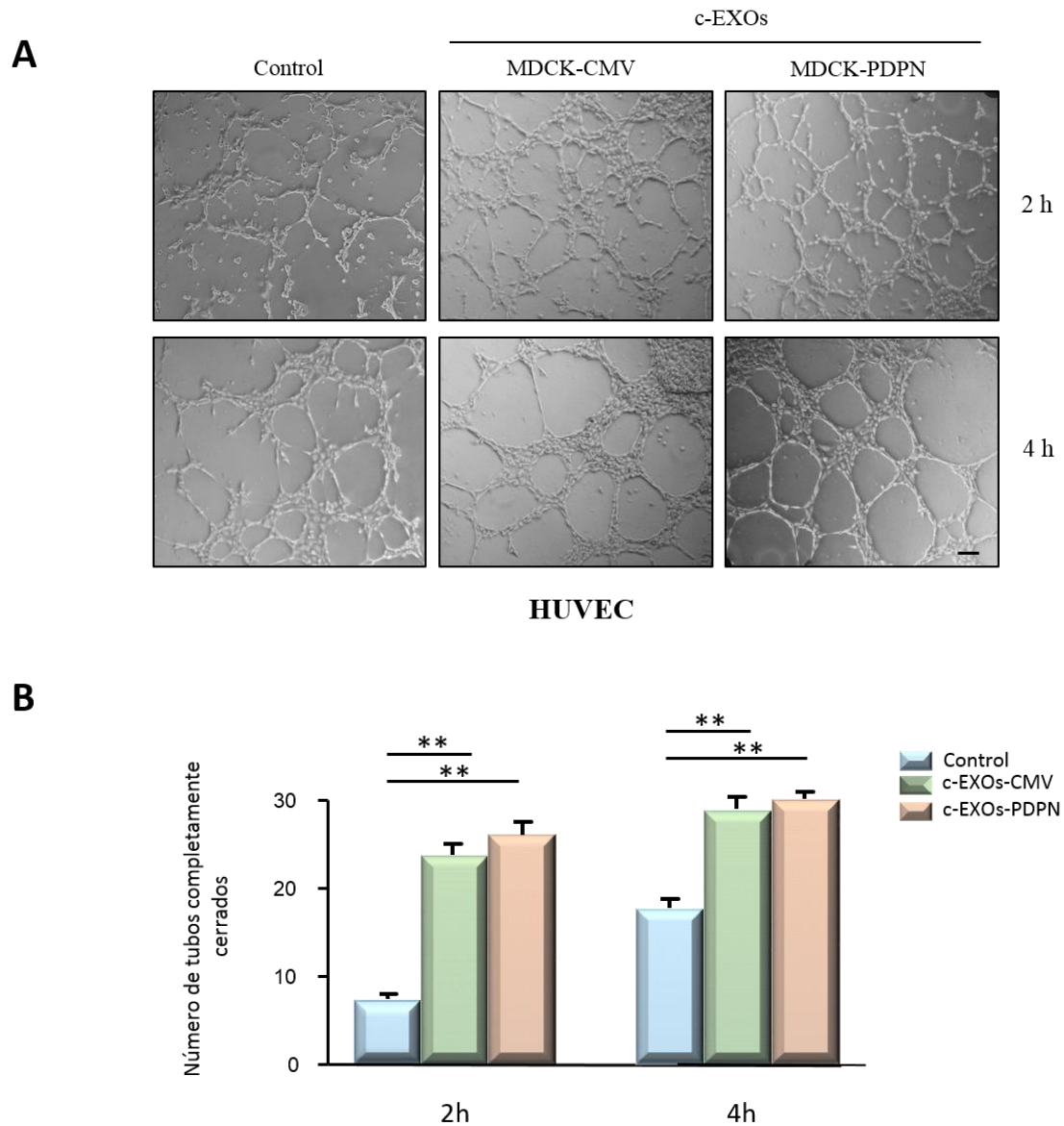
### 3. Efecto de exosomas-podoplanina en la angiogénesis y linfangiogénesis *in vitro*

Debido a que numerosos estudios han mostrado que EVs derivadas de distintos tipos de células tumorales son capaces de estimular la angiogénesis ([Muralidharan-Chari et al. 2010](#); [Raposo and Stoorvogel 2013](#); [Thery et al. 2009](#)) y debido a que PDPN se expresa en células endoteliales linfáticas y se le ha atribuido un papel en la morfogénesis del sistema vascular linfático ([Astarita et al. 2012](#); [Renart et al. 2015](#)), decidimos analizar el efecto de los c-EXOs-CMV y c-EXOs-PDPN en la angiogénesis y linfangiogénesis *in vitro*. Para estos estudios se emplearon cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y de células endoteliales linfáticas dérmicas (HLEC) humanas. Las células endoteliales se sembraron sobre pocillos recubiertos con Matrigel pobre en factores de crecimiento y se incubaron con 40  $\mu\text{g/ml}$  de c-EXOs-PDPN, c-EXOs-CMV o el mismo volumen de PBS. Como se observa en la **Figura 28A, B**, ambos tipos de c-EXOs estimulan la formación de nuevos vasos HUVECs con la misma eficacia. Sin embargo, sólo los EXOs derivados de MDCK-PDPN estimularon la formación de estructuras capilares linfáticas por HLECs. Los c-EXOs-PDPN aumentaron significativamente tanto la longitud de los tubos (**Figura 29 A, B**) como el número de estructuras capilares completamente cerradas (**Figura 30 A, B y 31 A, B**).

Para determinar si el efecto estimulador de c-EXOs-PDPN en la formación de vasos linfáticos estaba mediado por PDPN exosómico, los c-EXOs se preincubaron con el anticuerpo bloqueante NZ1 y con IgG de rata, como control. Como se observa en la **Figura 31A, B**, la preincubación con NZ1, pero no con IgG, bloqueó el efecto de c-EXOs-PDPN en la formación de vasos linfáticos de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo. Estos resultados sugieren que el efecto de c-EXOs-PDPN

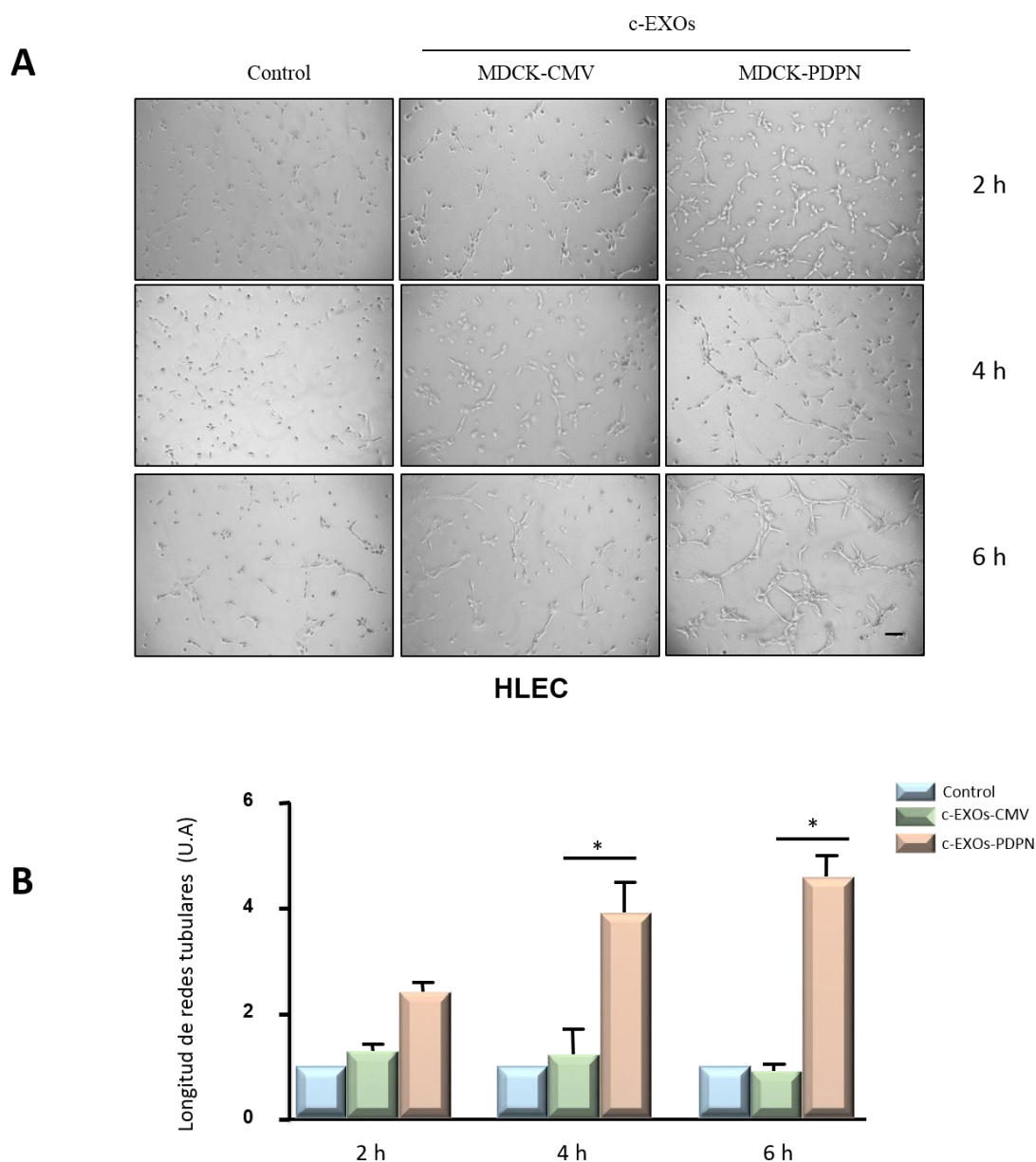


en la linfangiogénesis *in vitro* está mediado por PDPN presente en la membrana de las vesículas.

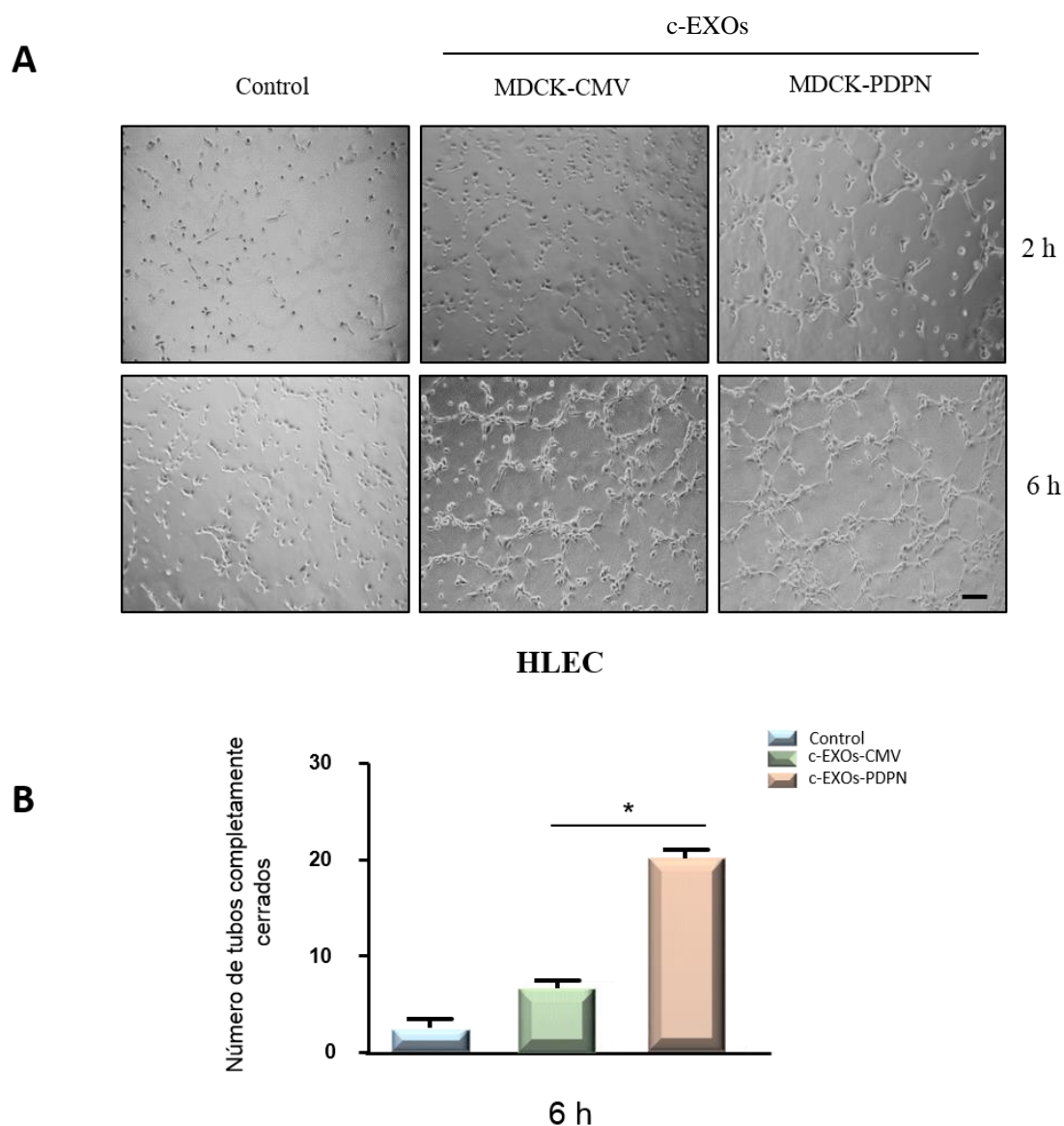


**Figura 28. Efecto de los exosomas en la angiogénesis *in vitro*.** Se sembraron  $1 \times 10^5$  células HUVEC sobre Matrigel pobre en factores de crecimiento y se añadieron 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de c-EXOs-PDPN, c-EXOs-CMV o el mismo volumen de PBS. **(A)** Micrografías representativas de la formación de estructuras capilares tras los tiempos de incubación indicados. Barra 150  $\mu\text{m}$ . **(B)** Determinación cuantitativa de la formación de estructuras capilares completamente cerradas. Los datos se expresan como el número de tubos cerrados por campo. En la figura se muestra un experimento representativo de tres independientes. \*\* $p < 0,01$

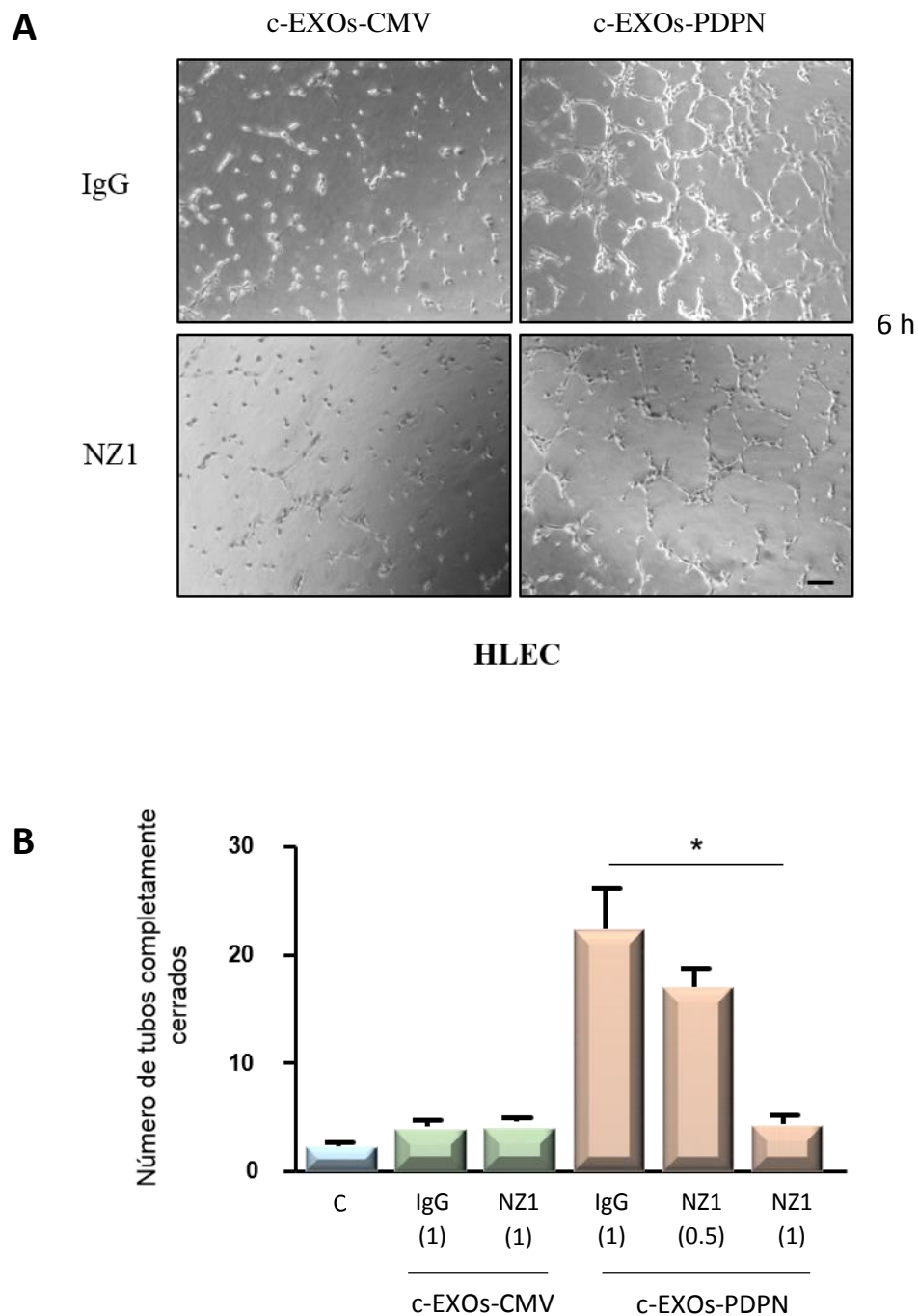




**Figura 29. Efecto de los exosomas en la longitud de estructuras tubulares de HLECs.** Se sembraron  $1 \times 10^5$  células HLEC sobre Matrigel pobre en factores de crecimiento y se añadieron  $40 \mu\text{g/ml}$  de c-EXOs-PDPN, c-EXOs-CMV y el mismo volumen de PBS. **(A)** Micrografías representativas de la formación de tubos tras los tiempos de incubación indicados. Barra,  $100 \mu\text{m}$ . **(B)** Determinación cuantitativa de la longitud de los tubos por campo. En la figura se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. \* $p < 0,05$ .



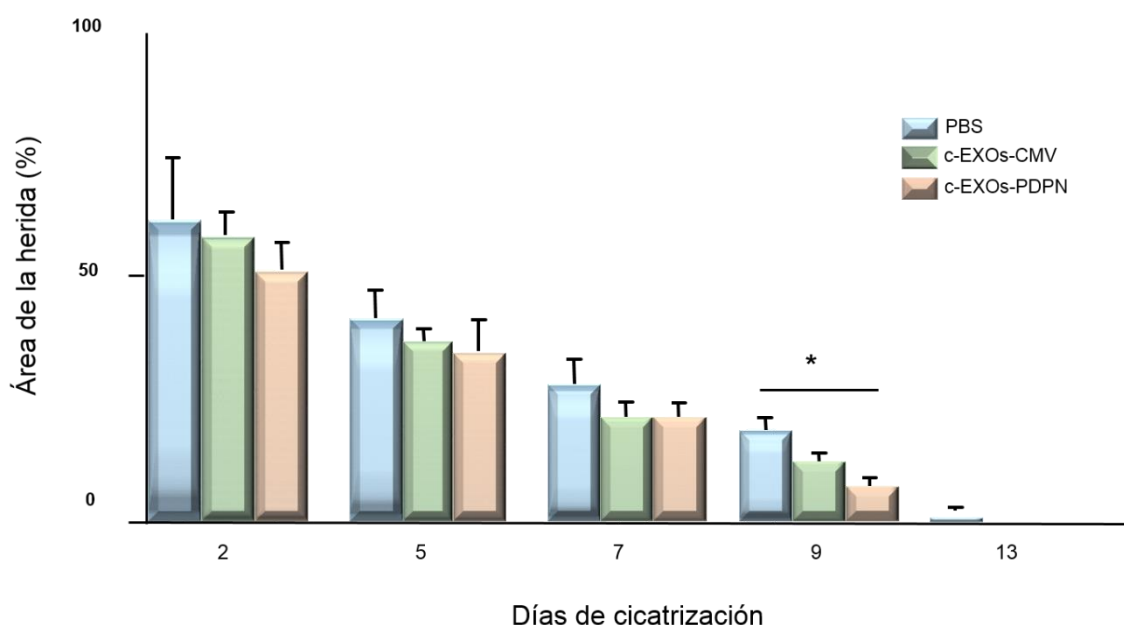
**Figura 30. Efecto de los exosomas en la linfangiogénesis *in vitro*.** Se sembraron  $1,2 \times 10^5$  células HLECs sobre Matrigel pobre en factores de crecimiento y se añadieron 40  $\mu\text{g/ml}$  de c-EXOs-PDPN, c-EXOs-CMV y el mismo volumen de PBS. **(A)** Micrografías representativas de la formación de estructuras capilares tras los tiempos indicados. Barra, 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Cuantificación de estructuras capilares completamente cerradas por campo. En la figura se muestra un experimento representativo de dos independientes. \* $p < 0,05$ .



**Figura 31. Podoplanina media la estimulación de la linfangiogénesis por los exosomas derivados de células MDCK-PDPN.** Se sembraron  $1,2 \times 10^5$  células HLEC sobre Matrigel pobre en factores de crecimiento. Los c-EXOs se preincubaron con el anticuerpo NZ1, que reconoce el dominio extracelular de PDPN, e IgG control durante 1 h, a  $4^\circ\text{C}$  y se añadieron a las células. Se utilizaron dos diluciones diferentes para el anticuerpo NZ1:  $0.5 \mu\text{g/ml}$  y  $1 \mu\text{g/ml}$ . **(A)** Micrografías representativas de la formación de estructuras capilares tras 6 h de tratamiento con los c-EXOs. Barra,  $100 \mu\text{m}$ . **(B)** Cuantificación de estructuras capilares completamente cerradas por campo. En la figura se muestra un experimento representativo de dos independientes.  $*p < 0,05$ .

#### 4. Efecto de los exosomas en la cicatrización de heridas *in vitro*

Nuestro laboratorio mostró hace varios años que la expresión de PDPN se induce en queratinocitos de la epidermis durante la cicatrización de heridas (Gandarillas et al. 1997) y que la expresión ectópica de PDPN en queratinocitos inmortalizados aumenta su capacidad migratoria (Scholl et al. 1999). Por esa razón decidimos analizar el efecto de c-EXOs derivados de células MDCK-CMV y MDCK-PDPN en la cicatrización de heridas *in vivo*. Para ello se realizaron heridas en la piel de ratones nu/nu y se analizó el cierre de las heridas durante los 2-13 días después de la lesión, tal como se indica en Materiales y métodos. Las heridas tratadas con ambos tipos de c-EXOs (**Figura 32**) mostraron una tendencia mayor al cierre con respecto a las heridas control (tratadas con PBS) durante todo el proceso de cicatrización. A los 9 días de cicatrización, se observó un aumento significativo (respecto al control PBS) en el cierre de las heridas tratadas con, c-EXOs-PDPN.



**Figura 32. Efecto de exosomas en el cierre de heridas cutáneas de ratones atímicos.** Se realizaron dos heridas, una en cada flanco de ratones nu/nu. Las heridas se trataron con c-EXOs derivados de las líneas MDCK-CMV y MDCK-PDPN (100 µg/ml), o el mismo volumen de PBS, el mismo día en que se realizaron y 2, 5, 7 y 9 días después. Los c-EXOs se inyectaron repartidos entre los dos bordes opuestos de cada herida. A los tiempos indicados en la Figura se midió el área de la herida. Se utilizaron 3 ratones (6 heridas) por grupo. \*p<0,05.

## DISCUSIÓN

---



## 1. Podoplanina es un componente de vesículas extracelulares

Los resultados de este trabajo apoyan fuertemente que PDPN es secretada al medio extracelular como un componente de EXOs y MVs tanto por líneas celulares en cultivo (**Figura 14**), como por tumores inducidos *in vivo* (**Figura 22**). Por tanto, hay que añadirla a la larga lista de proteínas asociadas a balsas lipídicas ([Barth et al. 2010](#); [Fernandez-Munoz et al. 2011](#)) presentes en EVs ([Colombo et al. 2014](#); [Tan et al. 2013](#)). Por otro lado, estos resultados indican que PDPN puede ser secretada directamente por gemación de la membrana plasmática asociada a MVs o bien seguir la vía endolisosomal, incorporándose a las vesículas intraluminales (EXOs) y liberándose al medio extracelular tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática. Las EVs liberadas por células que expresan PDPN no solo transportan la proteína sino también el mRNA, lo que refuerza la posibilidad de que pueda ser transferida a una célula diana (**Figura 15**).

Actualmente, el mecanismo por el cual PDPN es dirigida a endosomas tempranos y posteriormente a EXOs es desconocido. Se conocen diferentes rutas endocíticas que son usadas por la célula para llevar a cabo la internalización de receptores y/o ligandos de su superficie. En función de nuestros resultados, PDPN se internaliza a través de endocitosis mediada por clatrina, debido a su colocación con el marcador de endosomas tempranos EEA1 (**Figura 16**), aunque no se pueden descartar otros mecanismos, como macropinocitosis o el mediado por “ruffles” dorsales circulares, ambos dependientes de actina, o el mecanismo dependiente de flotilina ([Doherty and McMahon 2009](#)). A día de hoy, hemos podido validar que PDPN es secretada asociada a EXOs, pero no la manera de cómo esta proteína está siendo seleccionada para formar parte del contenido exosomal. Varios estudios han demostrado que muchas de las proteínas transmembrana seleccionadas para formar parte de los EXOs sufren mono-ubiquitinación ([Babst 2005](#)), y que algunas de ellas contienen una lisina en la posición 8 del dominio citoplasmático que es ubiquitinada ([Katzmann et al. 2001](#)). La PDPN humana tiene una lisina en la posición 2 del dominio citoplasmático que podría constituir un sitio de ubiquitinación; no obstante, los experimentos realizados para comprobar si PDPN es ubiquitinada dieron resultados negativos (datos no mostrados). Las proteínas ubiquitinadas son reconocidas por el complejo ESCRT e incorporadas a las ILVs de los MVBs. Por otro lado, otros estudios han demostrado que microdominios ricos en tetraspaninas, además de tener un papel en la adhesión celular, actúan como plataformas especializadas en la membrana plasmática para la compartimentalización selectiva de los receptores que van a ser secretados ([Andreu and Yanez-Mo 2014](#)). Curiosamente, PDPN interactúa con CD9 en

estos microdominios (Nakazawa et al. 2008) y esta interacción podría ser esencial para la segregación de PDPN en estas EVs. Además, CD9 está presente tanto en MVs como en EXOs (Yoshioka et al. 2013), al igual que PDPN (Figura 20).

## 2. Podoplanina promueve una transición epitelio-mesénquima asociada con la progresión maligna

La expresión de PDPN en la línea celular MDCK induce una EMT asociada con una expresión disminuida de marcadores epiteliales, tales como cadherina E, EPCAM y queratinas, un incremento en la expresión de marcadores mesenquimáticos, como cadherina N, y una estimulación de la migración e invasión celular. (Martin-Villar et al. 2006). El análisis detallado de los resultados de proteómica obtenidos en células MDCK-CMV y MDCK-PDPN revela que PDPN promueve una reprogramación proteica en las células MDCK que favorece el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis.

Muchas de las proteínas enriquecidas en células MDCK-PDPN (Tabla 5) son proteínas con actividad pro-oncogénica y se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer. Este es el caso de la SERPINE1, que desempeña un papel clave en la progresión tumoral promoviendo la proliferación, supervivencia y migración de las células tumorales mediante la modulación del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Bajou et al. 2001); EPS8 forma parte de un complejo multiproteico necesario para la remodelación del citoesqueleto de actina y, además, modula las funciones de Src y FAK durante la migración invasiva de SCCs (Offenhauser et al. 2004) (Schoenherr et al. 2014); PLOD2 es necesario para la biogénesis de las fibras de colágeno, un constituyente principal de la ECM. Se ha descrito que altos niveles de expresión de esta proteína incrementa la formación de colágeno fibrilar en células tumorales de mama favoreciendo con ello la rigidez del tumor y la metástasis a los ganglios linfáticos y a los pulmones (Gilkes et al. 2013); GNAS es una proteína de señalización ubicua que media los efectos de muchas hormonas, neurotransmisores y factores paracrinós/autocrinós a través de las vías del AMP cíclico y se activa constitutivamente en diferentes tumores (Turan and Bastepe 2015). Por otro lado, PTPN1 es un componente clave en redes de señalización implicadas en enfermedades metabólicas como la diabetes y la obesidad, y estimula la progresión tumoral (Bakke and Haj 2015). Numerosos estudios han demostrado que en las células tumorales el metabolismo se altera drásticamente en comparación con las células normales. Estas alteraciones se conocen como el efecto Warburg y se caracterizan por una utilización elevada de la glicolisis y la fermentación láctica como fuente de energía, incluso en condiciones de normoxia, lo que conlleva que las células tumorales se vuelvan adictas



a la glutamina. La glutaminasa (GLS) cuya expresión aumenta en células MDCK-PDPN, es la enzima clave para esta adicción (Katt and Cerione 2014).

Por otro lado, las proteínas que disminuyen su expresión en células MDCK-PDPN (**Tabla 6**) actúan como supresores tumorales. Es interesante mencionar AP1B1 y LLGL, ambas implicadas en el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales mediante la regulación del tráfico intracelular entre la zona apical y basolateral (Folsch 2005; Halaoui and McCaffrey 2015). La pérdida de la polaridad celular es un sello distintivo del cáncer epitelial (Martin-Belmonte and Perez-Moreno 2012). LLGL2 es un supresor tumoral cuya expresión disminuye en el cáncer gástrico y endometrial asociada a una EMT (Halaoui and McCaffrey 2015). ESPR1 funciona como un regulador global de “splicing” asociado a la EMT. Según los últimos estudios, cambios en el “splicing” que originan isoformas proteicas alternativas también juegan un papel importante en el proceso de EMT (Warzecha and Carstens 2012). Probablemente este sea el origen de las distintas variantes que se han observado en p120 catenina y CD44 durante la EMT inducida por PDPN en MDCK (Martin-Villar et al. 2010; Martin-Villar et al. 2006). SERPINB5 es un miembro no inhibidor de la familia de las serpinas que funciona de manera inversa a la SERPINE1/PAI1, actuando como un supresor tumoral e inhibiendo, por tanto, el crecimiento, la invasión y las propiedades metastásicas de las células tumorales (Zheng et al. 2013). Otras proteínas que disminuyen en MDCK-PDPN están relacionadas con la adhesión celular, como TES, un componente del citoesqueleto que se localiza a lo largo de las fibras de estrés en las uniones célula-célula y las adhesiones focales (Coutts et al. 2003), y ANXA6, una anexina que regula la adhesión y la proliferación celular (Sakwe et al. 2011). Finalmente, ISG15 es un antagonista de la vía canónica de ubiquitinación y se une a las proteínas celulares (ISGylation). Este proceso tiene funciones pro-tumorigénicas, pero cuando ISG15 es secretada al medio extracelular actúa como una citoquina inmunoreguladora ejerciendo un efecto anti-tumoral (Burks et al. 2015). Es posible que la disminución de ISG15 en células MDCK-PDPN pueda estar relacionado con esta última propiedad.

Los resultados anteriores sugieren una estrecha relación entre PDPN y la tumorigenicidad y está en línea con estudios previos de nuestro laboratorio en las que la expresión ectópica de PDPN en queratinocitos inmortalizados de piel, no tumorigénicos, confería a las células la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes que metastatizaban en los ganglios linfáticos (Scholl et al. 2000). Otros trabajos en modelos experimentales y en el cáncer humano demostraron con claridad que la expresión de PDPN se asocia con la progresión maligna y la metástasis (Martin-Villar et al. 2005; Renart et al. 2015). En esta Tesis, hemos confirmado una

relación directa de la expresión de PDPN con la capacidad tumorigénica de las células de carcinoma analizando la tumorigenicidad de las células HN5 en las que se había silenciado la expresión de PDPN. Nuestros resultados muestran una drástica disminución de la incidencia de tumores inducidos por las células interferidas con respecto a las células parentales y células control. Además, los tumores inducidos por HN5-sh3 y -sh4 estaban formados por células que expresaban niveles de PDPN similares a los de los tumores inducidos por las células control (**Figura 21**), lo que sugiere una selección de células que expresa niveles significativos de PDPN para la formación de tumores.

### 3. Podoplanina induce una reprogramación del contenido proteico de exosomas

Se identificaron un total de 454 proteínas en EXOs-PDPN y 294 proteínas en EXOs-CMV control, de las cuales 221 eran específicas para EXOs-PDPN en comparación con las 61 proteínas específicas identificadas en EXOs control. Estos datos ponen de manifiesto un enriquecimiento tanto cuantitativo como cualitativo de proteínas en EXOs-PDPN con respecto a EXOs control. El aumento del contenido proteico en EXOs-PDPN podría estar relacionado con la progresión maligna, ya que EXOs derivados de tumores altamente malignos contienen mayores cantidades de proteína que EXOs de tumores menos invasivos ([Peinado et al. 2012](#)). Curiosamente, la mayoría de las proteínas enriquecidas en EXOS-PDPN no se sobreexpresan a nivel celular en MDCK-PDPN. Entre ellas se encuentran receptores de adhesión célula-ECM y célula-célula, proteínas implicadas en la remodelación del citoesqueleto y componentes de vías de transducción de señales, en particular, pertenecientes a las rutas de las semaforinas y efrinas (**Tabla 7, 8 y 9**). Las semaforinas y efrinas, además de su papel en el crecimiento de axones y en el desarrollo del sistema nervioso han sido implicados en la angiogénesis, invasión tumoral y metástasis, así como en el reclutamiento y activación de células inmunes asociadas a tumores ([Cagnoni and Tamagnone 2014](#); [Takamatsu et al. 2010](#); [Xi et al. 2012](#)).

Del enriquecimiento de proteínas en PDPN-EXOs cabe destacar aquellas implicadas en la regulación del tráfico intracelular de vesículas (**Tabla 7**). De hecho, la proteína más abundante presente en EXOS-PDPN, que también se sobreexpresa en células MDCK-PDPN, es EHD2, la cual además de regular la adhesión y la motilidad celular está implicada en el control del transporte endocítico, aunque se desconoce su función exacta ([Simone et al. 2013](#)). Otras proteínas enriquecidas en EXOs-PDPN están involucradas en la biogénesis y secreción de EXOs, como los componentes de los

complejos ESCRT y SNARE (Colombo et al. 2014) o proteínas que coordinan el transporte intracelular de vesículas, tales como tetraspaninas, anexinas y miembros de las subfamilias RAB, RAL y RAP de GTPasas pequeñas. Además de su papel en el tráfico de membrana, las tetraspaninas participan en multitud de procesos biológicos, incluyendo la transducción de señales, la adhesión celular, la motilidad y la invasión de células tumorales (Haqqani et al. 2013). Entre los miembros de la familia de RAB GTPasas enriquecidas en EXOS-PDPN podemos destacar RAB35, involucrada en la liberación de EXOs principalmente de endosomas tempranos (Hsu et al. 2010). También RAB14 y RAB21, que son marcadores de endosomas tempranos (Agola et al. 2011), mientras que RAB7A se localiza en endosomas tardíos y lisosomas y participa en la liberación de EXOs que contienen Alix (Baietti et al. 2012). Otra proteína lisosomal enriquecida en EXOs-PDPN es LAMP1. Estas observaciones sugieren que EXOs-PDPN provienen de diferentes subpoblaciones de MVBs que se fusionan con la membrana plasmática, como se ha observado en EXOs secretados por diferentes tipos de células (Colombo et al. 2014). También hay un enriquecimiento de proteínas del citoesqueleto involucradas en el transporte vesicular y fusión de los MVBs con la membrana plasmática, tales como tubulinas y proteínas motoras, como quinesinas y miosinas (Raposo and Stoorvogel 2013) (Tabla 8). Otras proteínas enriquecidas en EXOs-PDPN están involucradas en la formación de balsa lipídicas como flotilina-1, -2 y ZDHHC5, una palmitoiltransferasa cuyo sustrato es flotilina-2 (Li et al. 2012). La palmitoilación parece jugar un papel importante en el tráfico intracelular de proteínas entre los compartimentos de membrana (Rocks et al. 2005). Las balsas lipídicas han sido implicadas en la selección de proteínas asociadas a EXOs (Tan et al. 2013).

Comparando el perfil proteómico de EXOs derivados de células MDCK-PDPN y otros proteomas publicados relacionados con la EMT, tales como los de EXOs secretados por células MDCK transformadas con el oncogén H-Ras (EXOs-H-Ras) (Ji et al. 2013) y células A431 con la expresión de cadherina E bloqueada y estimuladas con TGF- $\alpha$  (Garnier et al. 2013), se observa que, en ambos casos, existe un enriquecimiento de proteínas que controlan el tráfico vesicular en EXOs de células mesenquimáticas, que podría ser consecuencia de cambios en la fluidez y la dinámica de membranas impuesto por la EMT (Edmond et al. 2015). En particular, los perfiles proteómicos de EXOS-PDPN y EXOS-H-Ras revelaron un enriquecimiento de 21 proteínas comunes, incluyendo EHD2, ANXA4, ANXA5, CD151, TSPAN9, RAB21, RALA, ITGA6 e ITGAV, entre otras. Sin embargo, también hay diferencias importantes. Por ejemplo, el aumento en la expresión de las metaloproteasas MMP1 y MMP14 es específico de EXOs-H-Ras (Tauro et al. 2013), mientras que sólo en EXOs-PDPN se

observa un enriquecimiento de componentes de las vías de señalización de semaforinas y efrinas, lo que indica un alto grado de especificidad en las proteínas que son incorporadas en EXOs-HRas y EXOs-PDPN a pesar de la EMT.

#### 4. Una nueva función para podoplanina como modulador de la biogénesis de vesículas extracelulares

El aumento de proteínas implicadas en la biogénesis y secreción de vesículas contenidas en EXOs-PDPN sugería un posible papel de PDPN en la formación de EVs. La comparación cuantitativa de las EVs aisladas del mismo número de células MDCK, MDCK-CMV y MDCK-PDPN confirmó esta hipótesis. La producción de EVs (EXOs y MVs) aumentó significativamente en células MDCK-PDPN con respecto a MDCK-CMV (**Figura 20A, B**). Por esta razón se realizó un experimento de pérdida de función en las células de carcinoma HN5. En estas células el silenciamiento de PDPN no produce un cambio significativo en la morfología, aunque sí afecta al “spreading” ([Martin-Villar et al. 2010](#)). Los resultados obtenidos mostraron que las células con bajos niveles de PDPN, secretaban ~ 2 veces menos EXOs que las células control y exhibieron una tumorigenicidad reducida (**Figura 20C y Tabla 4**). En conjunto, estos datos sugieren un papel regulador de PDPN en la formación y/o secreción de EVs.

PDPN está anclada al citoesqueleto de actina por su interacción con las proteínas ERMs e induce su reorganización mediante la activación de RhoA y RhoC GTPasas ([Ito et al. 2012](#); [Martin-Villar et al. 2015](#); [Martin-Villar et al. 2006](#); [Navarro et al. 2008](#)). Su función en la biogénesis de EVs podría estar relacionada con procesos que dependen de la dinámica de actina-miosina, tales como la endocitosis, la fusión de membranas y la exocitosis ([Raposo and Stoorvogel 2013](#)). En este sentido, se ha demostrado recientemente una sinergia entre la formación de invadopodios y la secreción de EXOs en las células tumorales. La inhibición de la formación de estas estructuras reduce en gran medida la liberación de EXOs al medio extracelular ([Hoshino et al. 2013](#)). El silenciamiento de PDPN en las células HN5 reduce la estabilidad de los invadopodios ([Martin-Villar et al. 2015](#)), lo que podría contribuir también a una menor producción de EXOs en estas células.

## 5. Hacia una función biológica de exosomas-podoplanina como moduladores de la linfangiogénesis

Diversos estudios han demostrado que tanto PDPN como las EVs desempeñan un papel importante en diversos contextos biológicos tales como la respuesta inmune y el cáncer. De ahí, la importancia de estudiar la función que podría desempeñar PDPN asociada a EVs. En este trabajo, presentamos resultados preliminares que apoyan un papel de los c-EXOs-PDPN en la modulación de la linfangiogénesis (**Figuras 29 y 30**). Tanto c-EXOs-PDPN como c-EXOs-CMV fueron capaces de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, una característica compartida por EVs secretados por diferentes tipos de células tumorales (Greening et al. 2015; Muralidharan-Chari et al. 2010; Raposo and Stoorvogel 2013), pero solo los c-EXOs-PDPN estimularon la formación de vasos linfáticos, un efecto mediado por PDPN en la superficie de c-EXOs ya que fue abolido por un anticuerpo neutralizante específico (**Figura 31**). PDPN se expresa en células endoteliales linfáticas (Breiteneder-Geleff et al. 1999; Takahashi et al. 2015), y estudios anteriores demuestran un papel crucial de esta glicoproteína en la morfogénesis capilar y la migración polarizada de las células endoteliales linfáticas a través de la regulación de la actividad de GTPasas de la familia Rho (Navarro et al. 2008; Navarro et al. 2011). Curiosamente, PDPN soluble (una proteína recombinante con el dominio EC de PDPN fusionado a la región Fc de IgG) inhibe la linfangiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Cueni et al. 2010). Queda por establecer si el efecto de EXOs-PDPN implica la unión a quimiocinas linfáticas, como CCL21 (Kerjaschki et al. 2004), la interacción con un receptor de superficie celular, como CD9 (Iwasaki et al. 2013) o la internalización por las células endoteliales linfáticas. Esta característica podría ser relevante para la progresión maligna de las células tumorales que secretan EXOs-PDPN, ya que podría aumentar la linfangiogénesis alrededor de los tumores primarios y en los ganglios linfáticos, contribuyendo así a la formación del nicho linfovascular, y favoreciendo la diseminación de las células tumorales a órganos distantes (Stacker et al. 2014). En futuros experimentos estudiaremos el efecto de EXOs-PDPN en la linfangiogénesis y la metástasis *in vivo*.

La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y linfáticos (linfangiogénesis) ocurre también de forma fisiológica durante la cicatrización de heridas (Varricchi et al. 2015). Quizás el ligero efecto positivo de c-EXOs-PDPN en la cicatrización de heridas mostrado en el experimento de la **Figura 32** sea debido a la estimulación de estos procesos.

Finalmente, es importante señalar la posibilidad de que EXOs-PDPN puedan ser utilizados como biomarcadores diagnóstico/pronóstico en el cáncer. Ojalá los resultados de esta Tesis estimulen a otros grupos a analizar la presencia de vesículas que contienen PDPN en fluidos biológicos de pacientes con cáncer y a estudiar su posible correlación con parámetros clínicos.

## CONCLUSIONES

---





- I. Podoplanina es secretada al medio extracelular como un componente de los dos tipos principales de vesículas extracelulares, microvesículas y exosomas. El mRNA de podoplanina también forma parte del contenido de estas vesículas.
- II. Podoplanina se localiza en la membrana de vesículas extracelulares con la misma orientación que en la membrana plasmática de la célula, con el dominio extracelular hacia al exterior.
- III. Podoplanina estimula la biogénesis/secreción de microvesículas y exosomas en células en cultivo.
- IV. Podoplanina promueve una reprogramación celular de la expresión de proteínas asociadas con la transición epitelio-mesénquima y la progresión maligna. El análisis proteómico realizado en esta Tesis demuestra que podoplanina induce un aumento de la expresión de proteínas pro-oncogénicas y una disminución de proteínas supresoras tumorales.
- V. Podoplanina promueve una reprogramación del contenido proteico de exosomas, favoreciendo la incorporación a estas vesículas de proteínas implicadas en la endocitosis, el tráfico vesicular, la adhesión celular y la remodelación del citoesqueleto.
- VI. Los exosomas que contienen podoplanina estimulan la angiogénesis y la linfangiogénesis *in vitro*.
- VII. Mientras que la estimulación de la angiogénesis por los exosomas es inespecífica, la estimulación de la linfangiogénesis es dependiente de la presencia de podoplanina en la superficie de las vesículas.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Acton SE**, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR, Jakus Z, Kuligowski M, Fletcher AL, Elpek KG, Bellemare-Pelletier A, Sceats L, Reynoso ED, Gonzalez SF, Graham DB, Chang J, Peters A, Woodruff M, Kim YA, Swat W, Morita T, Kuchroo V, Carroll MC, Kahn ML, Wucherpfennig KW, Turley SJ (2012) Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* 37:276-89
- Acton SE**, Farrugia AJ, Astarita JL, Mourao-Sa D, Jenkins RP, Nye E, Hooper S, van Blijswijk J, Rogers NC, Snelgrove KJ, Rosewell I, Moita LF, Stamp G, Turley SJ, Sahai E, Reis e Sousa C (2014) Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 514:498-502
- Agola JO**, Jim PA, Ward HH, Basuray S, Wandinger-Ness A (2011) Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin Genet* 80:305-18
- Al-Nedawi K**, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J (2009) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3794-9
- Andreola G**, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S (2002) Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195:1303-16
- Andreu Z**, Yanez-Mo M (2014) Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 5:442
- Arpin M**, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I (2011) Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 5:199-206
- Astarita JL**, Acton SE, Turley SJ (2012) Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol* 3:283
- Astarita JL**, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, Song K, Kondo Y, Woodruff MC, Gogineni A, Onder L, Ludewig B, Weimer RM, Carroll MC, Mooney DJ, Xia L, Turley SJ (2015) The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 16:75-84
- Azmi AS**, Bao B, Sarkar FH (2013) Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32:623-42
- Babst M** (2005) A protein's final ESCRT. *Traffic* 6:2-9
- Baietti MF**, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677-85
- Bajou K**, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2001) The plasminogen activator inhibitor PAI-

- 1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 152:777-84
- Bakke J**, Haj FG (2015) Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol* 37:58-65
- Barth K**, Blasche R, Kasper M (2010) T1alpha/podoplanin shows raft-associated distribution in mouse lung alveolar epithelial E10 cells. *Cell Physiol Biochem* 25:103-12
- Battle E**, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2:84-9
- Benito-Martin A**, Di Giannatale A, Ceder S, Peinado H (2015) The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol* 6:66
- Bernhard OK**, Greening DW, Barnes TW, Ji H, Simpson RJ (2013) Detection of cadherin-17 in human colon cancer LIM1215 cell secretome and tumour xenograft-derived interstitial fluid and plasma. *Biochim Biophys Acta* 1834:2372-9
- Bolukbasi MF**, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Strobel T, Erkan EP, Fan JB, Breakefield XO, Saydam O (2012) miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 1:e10
- Bonifacino JS**, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-66
- Breiteneder-Geleff S**, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D (1997) Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151:1141-52
- Breiteneder-Geleff S**, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D (1999) Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 154:385-94
- Brett TJ**, Traub LM (2006) Molecular structures of coat and coat-associated proteins: function follows form. *Curr Opin Cell Biol* 18:395-406
- Burks J**, Reed RE, Desai SD (2015) Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: a new perspective. *Oncotarget* 6:7221-31
- Buschow SI**, Nolte-'t Hoen EN, van Niel G, Pols MS, ten Broeke T, Lauwen M, Ossendorp F, Melief CJ, Raposo G, Wubbolts R, Wauben MH, Stoorvogel W (2009) MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 10:1528-42
- Cagnoni G**, Tamagnone L (2014) Semaphorin receptors meet receptor tyrosine kinases on the way of tumor progression. *Oncogene* 33:4795-802

- Cano A**, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83
- Castellana D**, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, Kunzelmann C (2009) Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 69:785-93
- Colombo M**, Raposo G, Thery C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255-89
- Coutts AS**, MacKenzie E, Griffith E, Black DM (2003) TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci* 116:897-906
- Cueni LN**, Chen L, Zhang H, Marino D, Huggenberger R, Alitalo A, Bianchi R, Detmar M (2010) Podoplanin-Fc reduces lymphatic vessel formation in vitro and in vivo and causes disseminated intravascular coagulation when transgenically expressed in the skin. *Blood* 116:4376-84
- Cueni LN**, Detmar M (2009) Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp Cell Res* 315:1715-23
- Chairoungdua A**, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ (2010) Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190:1079-91
- Chaput N**, Thery C (2011) Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 33:419-40
- Chu AY**, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ (2005) Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 18:105-10
- De Gassart A**, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102:4336-44
- Demory Beckler M**, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, Whitwell C, Li M, Liebler DC, Coffey RJ (2013) Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics* 12:343-55
- Doherty GJ**, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902
- Dolo V**, Ginestra A, Cassara D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A, Vittorelli ML (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58:4468-74
- Dumoff KL**, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G (2006) Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-

- stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol* 19:708-16
- Edmond V**, Dufour F, Poiroux G, Shoji K, Malleter M, Fouque A, Tauzin S, Rimokh R, Sergent O, Penna A, Dupuy A, Levade T, Theret N, Micheau O, Segui B, Legembre P (2015) Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* 34:996-1005
- El Andaloussi S**, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ (2013) Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12:347-57
- Farr AG**, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A (1992) Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med* 176:1477-82
- Fehon RG**, McClatchey AI, Bretscher A (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:276-87
- Fernandez-Munoz B**, Yurrita MM, Martin-Villar E, Carrasco-Ramirez P, Megias D, Renart J, Quintanilla M (2011) The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol* 43:886-96
- Folsch H** (2005) The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol* 15:222-8
- Fukunaga M** (2005) Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology* 46:396-402
- Gandarillas A**, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M (1997) Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20:10-8
- Garnier D**, Magnus N, Meehan B, Kislinger T, Rak J (2013) Qualitative changes in the proteome of extracellular vesicles accompanying cancer cell transition to mesenchymal state. *Exp Cell Res* 319:2747-57
- Gilkes DM**, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL (2013) Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 11:456-66
- Graham R**, Graham C, McMullan G (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microb Cell Fact* 6:26
- Greening DW**, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W (2015) Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*
- Gupta GP**, Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-95
- Halaoui R**, McCaffrey L (2015) Rewiring cell polarity signaling in cancer. *Oncogene* 34:939-50



- Hammer JA**, 3rd, Wu XS (2002) Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 14:69-75
- Hanson PI**, Cashikar A (2012) Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:337-62
- Haqqani AS**, Delaney CE, Tremblay TL, Sodja C, Sandhu JK, Stanimirovic DB (2013) Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. *Fluids Barriers CNS* 10:4
- Harding C**, Heuser J, Stahl P (1984) Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 35:256-63
- Harding CV**, Heuser JE, Stahl PD (2013) Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* 200:367-71
- Hemler ME** (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:801-11
- Ho CS**, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 24:3-12
- Honma M**, Minami-Hori M, Takahashi H, Iizuka H (2012) Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci* 65:134-40
- Hoshino D**, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM (2013) Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep* 5:1159-68
- Hsu C**, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Gronborg M, Mobius W, Rhee J, Barr FA, Simons M (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189:223-32
- Ikonen E** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13:4707
- Ismail N**, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB (2013) Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121:984-95
- Ito S**, Ishii G, Hoshino A, Hashimoto H, Neri S, Kuwata T, Higashi M, Nagai K, Ochiai A (2012) Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. *Biochem Biophys Res Commun* 422:194-9
- Iwasaki T**, Takeda Y, Maruyama K, Yokosaki Y, Tsujino K, Tetsumoto S, Kuhara H, Nakanishi K, Otani Y, Jin Y, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Suzuki M, Inoue K, Nagatomo I, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Tachibana I, Kawase I, Kumanogoh A (2013) Deletion of tetraspanin CD9 diminishes lymphangiogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 288:2118-31

- Jahn R**, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-43
- Ji H**, Greening DW, Barnes TW, Lim JW, Tauro BJ, Rai A, Xu R, Adda C, Mathivanan S, Zhao W, Xue Y, Xu T, Zhu HJ, Simpson RJ (2013) Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* 13:1672-86
- Kalra H**, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borrás FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Kramer-Albers EM, Lim SK, Llorente A, Lotvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen EN, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TS, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sanchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BW, Vazquez J, Vidal M, Wauben MH, Yanez-Mo M, Zoeller M, Mathivanan S (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 10:e1001450
- Kaneko MK**, Kato Y, Kameyama A, Ito H, Kuno A, Hirabayashi J, Kubota T, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Sasagawa I, Mishima K, Narimatsu H (2007) Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. *FEBS Lett* 581:331-6
- Kato Y**, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, Tsuruo T (2003) Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem* 278:51599-605
- Kato Y**, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M (2005) Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 26:195-200
- Kato Y**, Kaneko MK (2014) A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. *Sci Rep* 4:5924
- Kato Y**, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T (2004) Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene* 23:8552-6
- Katt WP**, Cerione RA (2014) Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discov Today* 19:450-7
- Katzmann DJ**, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145-55
- Kenmotsu H**, Ishii G, Nagai K, Nakao M, Kawase A, Kojika M, Murata Y, Nishiwaki Y, Ochiai A (2008) Pleomorphic carcinoma of the lung expressing podoplanin and calretinin. *Pathol Int* 58:771-4
- Kerjaschki D**, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, Raab I (2004) Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is

- associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 15:603-12
- Kim DK**, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC, Park KS, Choi EJ, Kim KP, Desiderio DM, Kim YK, Lotvall J, Hwang D, Gho YS (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2
- Kimura N**, Kimura I (2005) Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 55:83-6
- Kleijmeer MJ**, Raposo G, Geuze HJ (1996) Characterization of MHC Class II Compartments by Immunoelectron Microscopy. *Methods* 10:191-207
- Kotani M**, Osanai T, Tajima Y, Kato H, Imada M, Kaneda H, Kubo H, Sakuraba H (2002) Identification of neuronal cell lineage-specific molecules in the neuronal differentiation of P19 EC cells and mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 67:595-606
- Krishnan H**, Ochoa-Alvarez JA, Shen Y, Nevel E, Lakshminarayanan M, Williams MC, Ramirez MI, Miller WT, Goldberg GS (2013) Serines in the intracellular tail of podoplanin (PDPN) regulate cell motility. *J Biol Chem* 288:12215-21
- Laulagnier K**, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M (2004) Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380:161-71
- Laulagnier K**, Vincent-Schneider H, Hamdi S, Subra C, Lankar D, Record M (2005) Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells Mol Dis* 35:116-21
- Li Y**, Martin BR, Cravatt BF, Hofmann SL (2012) DHHC5 protein palmitoylates flotillin-2 and is rapidly degraded on induction of neuronal differentiation in cultured cells. *J Biol Chem* 287:523-30
- Lv MM**, Zhu XY, Chen WX, Zhong SL, Hu Q, Ma TF, Zhang J, Chen L, Tang JH, Zhao JH (2014) Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol* 35:10773-9
- Llorente A**, Skotland T, Sylvanne T, Kauhanen D, Rog T, Orlowski A, Vattulainen I, Ekroos K, Sandvig K (2013) Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1831:1302-9
- Mahtab EA**, Vicente-Steijn R, Hahurij ND, Jongbloed MR, Wisse LJ, DeRuiter MC, Uhrin P, Zaujec J, Binder BR, Schalij MJ, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (2009) Podoplanin deficient mice show a RhoA-related hypoplasia of the sinus venosus myocardium including the sinoatrial node. *Dev Dyn* 238:183-93
- Mahtab EA**, Wijffels MC, Van Den Akker NM, Hahurij ND, Lie-Venema H, Wisse LJ, Deruiter MC, Uhrin P, Zaujec J, Binder BR, Schalij MJ, Poelmann RE, Gittenberger-De Groot AC (2008) Cardiac malformations and myocardial

- abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. *Dev Dyn* 237:847-57
- Marks A**, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, Banerjee D, Bauml R (1999) Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 80:569-78
- Martin-Belmonte F**, Perez-Moreno M (2012) Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:23-38
- Martin-Villar E**, Borda-d'Agua B, Carrasco-Ramirez P, Renart J, Parsons M, Quintanilla M, Jones GE (2015) Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene* 20;34(34):4531-44.
- Martin-Villar E**, Fernandez-Munoz B, Parsons M, Yurrita MM, Megias D, Perez-Gomez E, Jones GE, Quintanilla M (2010) Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* 21:4387-99
- Martin-Villar E**, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 119:4541-53
- Martin-Villar E**, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M (2005) Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 113:899-910
- Mathivanan S**, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* 40:D1241-4
- Mathivanan S**, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73:1907-20
- Mathivanan S**, Ji H, Tauro BJ, Chen YS, Simpson RJ (2012) Identifying mutated proteins secreted by colon cancer cell lines using mass spectrometry. *J Proteomics* 76 Spec No.:141-9
- Mears R**, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, Patel P, Selby PJ, Banks RE (2004) Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4:4019-31
- Mishima K**, Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N, Tsuruo T, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M (2006a) Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol* 111:563-8
- Mishima K**, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M (2006b) Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol* 111:483-8
- Mitra SK**, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:56-68

- Mittelbrunn M**, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282
- Montecalvo A**, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE (2012) Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119:756-66
- Morelli AE**, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Jr., Thomson AW (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104:3257-66
- Muralidharan-Chari V**, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19:1875-85
- Muralidharan-Chari V**, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123:1603-11
- Nakazawa Y**, Sato S, Naito M, Kato Y, Mishima K, Arai H, Tsuruo T, Fujita N (2008) Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* 112:1730-9
- Naqvi J**, Ordonez NG, Luna MA, Williams MD, Weber RS, El-Naggar AK (2008) Epithelioid hemangioendothelioma of the head and neck: role of podoplanin in the differential diagnosis. *Head Neck Pathol* 2:25-30
- Navarro A**, Perez RE, Rezaiekhalthigh M, Mabry SM, Ekekezie, II (2008) T1alpha/podoplanin is essential for capillary morphogenesis in lymphatic endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L543-51
- Navarro A**, Perez RE, Rezaiekhalthigh MH, Mabry SM, Ekekezie, II (2011) Polarized migration of lymphatic endothelial cells is critically dependent on podoplanin regulation of Cdc42. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300:L32-42
- Nose K**, Saito H, Kuroki T (1990) Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1:511-8
- Offenhauser N**, Borgonovo A, Disanza A, Romano P, Ponzanelli I, Iannolo G, Di Fiore PP, Scita G (2004) The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Mol Biol Cell* 15:91-8
- Ordonez NG** (2006) Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* 13:83-8

- Pan BT**, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942-8
- Peduto L**, Dulauroy S, Lochner M, Spath GF, Morales MA, Cumano A, Eberl G (2009) Inflammation recapitulates the ontogeny of lymphoid stromal cells. *J Immunol* 182:5789-99
- Pegtel DM**, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6328-33
- Peinado H**, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18:883-91
- Peinado H**, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-28
- Peterziel H**, Muller J, Danner A, Barbus S, Liu HK, Radlwimmer B, Pietsch T, Lichter P, Schutz G, Hess J, Angel P (2012) Expression of podoplanin in human astrocytic brain tumors is controlled by the PI3K-AKT-AP-1 signaling pathway and promoter methylation. *Neuro Oncol* 14:426-39
- Pitt JJ** (2009) Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* 30:19-34
- Ponta H**, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:33-45
- Raposo G**, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161-72
- Raposo G**, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373-83
- Record M**, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M (2011) Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol* 81:1171-82
- Renart J**, Carrasco-Ramirez P, Fernandez-Munoz B, Martin-Villar E, Montero L, Yurrita MM, Quintanilla M (2015) New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol* 317:185-239
- Rishi AK**, Joyce-Brady M, Fisher J, Dobbs LG, Floros J, VanderSpek J, Brody JS, Williams MC (1995) Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol* 167:294-306



- Rocks O**, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307:1746-52
- Russ WP**, Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296:911-9
- Sahu R**, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potalicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* 20:131-9
- Sakwe AM**, Koumangoye R, Guillory B, Ochieng J (2011) Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions. *Exp Cell Res* 317:823-37
- Sarrio, J. D.** (2007) Alteraciones moleculares del complejo de adhesión cadherinas-cateninas y su implicación en el cáncer de mama, Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.
- Schacht V**, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166:913-21
- Schacht V**, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 22:3546-56
- Schmidt O**, Teis D (2012) The ESCRT machinery. *Curr Biol* 22:R116-20
- Schoenherr C**, Serrels B, Proby C, Cunningham DL, Findlay JE, Baillie GS, Heath JK, Frame MC (2014) Eps8 controls Src- and FAK-dependent phenotypes in squamous carcinoma cells. *J Cell Sci* 127:5303-16
- Scholl FG**, Gamallo C, Quintanilla M (2000) Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab Invest* 80:1749-59
- Scholl FG**, Gamallo C, Vilaro S, Quintanilla M (1999) Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24):4601-13
- Shevchenko A**, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-60
- Shibahara J**, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M (2006) Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system. *Virchows Arch* 448:493-9
- Shintaku M**, Honda T, Sakai T (2010) Expression of podoplanin and calretinin in meningioma: an immunohistochemical study. *Brain Tumor Pathol* 27:23-7

- Simone LC**, Caplan S, Naslavsky N (2013) Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulating EHD2 plasma membrane localization. *PLoS One* 8:e74519
- Simons M**, Raposo G (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21:575-81
- Skog J**, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470-6
- Smith SM**, Melrose J (2011) Podoplanin is expressed by a sub-population of human foetal rib and knee joint rudiment chondrocytes. *Tissue Cell* 43:39-44
- Song Y**, Shen J, Lin Y, Shen J, Wu X, Yan Y, Zhou L, Zhang H, Zhou Y, Cao M, Liu Y (2014) Up-regulation of podoplanin involves in neuronal apoptosis in LPS-induced neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* 34:839-49
- Sonne SB**, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E (2006) Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Arch* 449:200-6
- Stacker SA**, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG (2014) Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer* 14:159-72
- Stenmark H** (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-25
- Stinchcombe JC**, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM (2001) Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol* 152:825-34
- Stoeck A**, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393:609-18
- Stoorvogel W**, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3:321-30
- Takahashi A**, Ishii G, Neri S, Yoshida T, Hashimoto H, Suzuki S, Umemura S, Matsumoto S, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Nagai K, Gemma A, Ohe Y, Ochiai A (2015) Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts inhibit small cell lung cancer growth. *Oncotarget* 6:9531-41
- Takamatsu H**, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A (2010) Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* 11:594-600



- Tan SS**, Yin Y, Lee T, Lai RC, Yeo RW, Zhang B, Choo A, Lim SK (2013) Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 10.3402/jev.v2i0.22614
- Tauro BJ**, Mathias RA, Greening DW, Gopal SK, Ji H, Kapp EA, Coleman BM, Hill AF, Kusebauch U, Hallows JL, Shteynberg D, Moritz RL, Zhu HJ, Simpson RJ (2013) Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-derived exosomal proteins following epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Proteomics* 12:2148-59
- Thakur BK**, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24:766-9
- Theos AC**, Berson JF, Theos SC, Herman KE, Harper DC, Tenza D, Sviderskaya EV, Lamoreux ML, Bennett DC, Raposo G, Marks MS (2006) Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell* 17:3598-612
- Thery C**, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9:581-93
- Thiery JP**, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-90
- Trajkovic K**, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-7
- Tsukita S**, Yonemura S (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274:34507-10
- Tsuneki M**, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Essa A, Abe T, Babkair H, Cheng J, Yamamoto T, Saku T (2013a) Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434:124-30
- Tsuneki M**, Yamazaki M, Maruyama S, Cheng J, Saku T (2013b) Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 93:921-32
- Turan S**, Bastepe M (2015) GNAS Spectrum of Disorders. *Curr Osteoporos Rep* 13:146-58
- Valadi H**, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-9
- Valapala M**, Vishwanatha JK (2011) Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *J Biol Chem* 286:30911-25

- Van Niel G**, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2001) Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121:337-49
- Varricchi G**, Granata F, Loffredo S, Genovese A, Marone G (2015) Angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory skin disorders. *J Am Acad Dermatol* 73:144-53
- Verheul HM**, Hoekman K, Lupu F, Broxterman HJ, van der Valk P, Kakkar AK, Pinedo HM (2000) Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 6:166-71
- Verheul HM**, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM (1997) Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 3:2187-90
- Verweij FJ**, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Vendrig T, Wurdinger T, Cahir-McFarland E, Kieff E, Geerts D, van der Kant R, Neefjes J, Middeldorp JM, Pegtel DM (2011) LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-kappaB activation. *EMBO J* 30:2115-29
- Wadhwa R**, Taira K, Kaul SC (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones* 7:309-16
- Warzecha CC**, Carstens RP (2012) Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Semin Cancer Biol* 22:417-27
- Webber JP**, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD, Tabi Z, Clayton A (2015) Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 34:290-302
- Wetterwald A**, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, Atkinson M (1996) Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 18:125-32
- Wicki A**, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9:261-72
- Wilhelm M**, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H, Mathieson T, Lemeer S, Schnatbaum K, Reimer U, Wenschuh H, Mollenhauer M, Slotta-Huspenina J, Boese JH, Bantscheff M, Gerstmair A, Faerber F, Kuster B (2014) Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 509:582-7
- Wubbolts R**, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmair G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278:10963-72
- Yanez-Mo M**, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Sanchez-Madrid F (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 19:434-46

- Yonemura S**, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140:885-95
- Yoshioka Y**, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T (2013) Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles* 2
- Yuan P**, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L (2006) Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 107:563-9
- Yurrita MM**, Fernandez-Munoz B, Del Castillo G, Martin-Villar E, Renart J, Quintanilla M (2014) Podoplanin is a substrate of presenilin-1/gamma-secretase. *Int J Biochem Cell Biol* 46:68-75
- Xi HQ**, Wu XS, Wei B, Chen L (2012) Aberrant expression of EphA3 in gastric carcinoma: correlation with tumor angiogenesis and survival. *J Gastroenterol* 47:785-94
- Zhang HG**, Grizzle WE (2011) Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 17:959-64
- Zheng D**, Chen H, Davids J, Bryant M, Lucas A (2013) Serpins for diagnosis and therapy in cancer. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 13:123-32
- Zick Y**, Eisenstein M, Goren RA, Hadari YR, Levy Y, Ronen D (2004) Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J* 19:517-26
- Zimmer G**, Klenk HD, Herrler G (1995) Identification of a 40-kDa cell surface sialoglycoprotein with the characteristics of a major influenza C virus receptor in a Madin-Darby canine kidney cell line. *J Biol Chem* 270:17815-22
- Zimmer G**, Lottspeich F, Maisner A, Klenk HD, Herrler G (1997) Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J* 326 ( Pt 1):99-108
- Zitvogel L**, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4:594-600
- Zoller M** (2011) CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11:254-67
- Zylbersztejn K**, Galli T (2011) Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J* 278:4497-505



**ANEXOS**



Una parte importante del trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente publicación:

- **Carrasco-Ramírez P**, Greening DW, Andrés G, Gopal SK, Martín-Villar E, Renart J, Simpson RJ and Quintanilla M. Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation. *Oncotarget*. 2016 Feb 17. doi: 10.18632/oncotarget.7445.

Además, durante la realización de esta Tesis Doctoral he colaborado en las siguientes publicaciones:

- Renart J, **Carrasco-Ramírez P**, Fernández-Muñoz B, Martín-Villar E, Montero L, Yurrita MM, Quintanilla M. New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015; 317: 185-239. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.009. Epub 2015 Mar 5.
- Martín-Villar E, d'Água BB, **Carrasco-Ramírez P**, Renart J, Parsons M, Quintanilla M and Jones GE. Podoplanin mediates ECM degradation through control of invadopodia stability in squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2015 Dec 8; 0. doi: 10.1038/onc.2014.388.
- Fernández-Muñoz B, Yurrita MM, Martín-Villar E, **Carrasco-Ramírez P**, Megías D, Renart J, Quintanilla M. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jun; 43(6):886-96. doi: 10.1016/j.biocel.2011.02.010. Epub 2011 Mar 3.





**TABLA SUPLEMENTARIA – Lista completa de proteínas (Proteómica)**

NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA (en su denominación inglesa)	ESPECTRO DE MASAS				Rsc	
		EXO		WCL		EXO	WCL
		PDPN	CMV	PDPN	CMV	PDPN vs CMV	PDPN vs CMV
PLS3	Plastin-3 (T-plastin)	2	0	36	0	28,6	1,7
EHD2	EHD2 EH-domain containing 2	33	0	21	1	9,5	17,8
KTN1	kinectin 1 (kinesin receptor)	0	0	10	0	8,6	-1,6
PLOD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate	0	0	10	0	8,6	-1,6
GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s)	8	4	8	0	7,1	1,1
HADHB	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0	0	8	0	7,1	-1,6
SERPINE1	Serpine 1 protein	0	0	7	0	6,3	-1,6
COL1A2	Collagen alpha-2(I)	0	0	7	0	6,3	-1,6
KNG1	Kininogen-1 (Kininogen I)	0	0	7	0	6,3	-1,6
EPS8	Uncharacterized protein	3	16	7	0	6,3	-6,3
CD109	Uncharacterized protein	4	0	6	0	5,6	2,7
FERMT2	Fermitin family homolog 2 (Kindlin-2)	2	0	6	0	5,6	1,7
GLS	Glutaminase	0	0	6	0	5,6	-1,6
SCFD1	Uncharacterized protein	0	0	6	0	5,6	-1,6
CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demethylase	0	0	6	0	5,6	-1,6
PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor	0	0	6	0	5,6	-1,6
SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha	0	0	6	0	5,6	-1,6
PTGIS	Uncharacterized protein	5	0	5	0	4,8	3,2
PRAF2	PRA1 family protein 2	1	0	5	0	4,8	1,2
RPL18A	60S ribosomal protein L18a	0	0	5	0	4,8	-1,6
FHOD1	Uncharacterized protein	0	0	5	0	4,8	-1,6
SUCLA2	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit	0	0	5	0	4,8	-1,6
40057	Uncharacterized protein (Fragment)	0	0	5	0	4,8	-1,6
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	0	0	5	0	4,8	-1,6
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain (TM30p1)	1	1	5	0	4,8	-1,6
CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	2	6	5	0	4,8	-3,5
SERPINB8	Serpin peptidase inhibitor, clade B	0	0	9	1	4,4	-1,6
MYO1B	Unconventional myosin-Ib	14	0	4	0	4,0	7,9
CD82	CD82 protein	14	0	4	0	4,0	7,9
LRP1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1	0	4	0	4,0	1,2
BLMH	Bleomycin hydrolase	0	0	4	0	4,0	-1,6
HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0	0	4	0	4,0	-1,6
PRRC1	Proline-rich coiled-coil 1	0	0	4	0	4,0	-1,6
TMX1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	0	2	4	0	4,0	-4,0
UBA6	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	0	0	8	1	3,9	-1,6
PLOD3	N-alpha-acetyltransferase 15	0	0	12	2	3,9	-1,6
TSN	Protein kinase C, delta binding protein	0	0	7	1	3,5	-1,6
NAA15	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor)	0	0	7	1	3,5	-1,6
PRKCDBP	Ferritin light chain (Ferritin L subunit)	0	0	10	2	3,3	-1,6
ITGA5	Tetraspanin 9	14	0	3	0	3,3	7,9
FTL	HTRA1 - Serine protease HTRA1 precursor	11	0	3	0	3,3	6,3
TSPAN9	MNDA - Myeloid cell nuclear differentiation	9	0	3	0	3,3	5,3
HTRA1	Oxysterol-binding protein	2	0	3	0	3,3	1,7
MNDA	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	0	0	3	0	3,3	-1,6
OSBP	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	0	0	3	0	3,3	-1,6
FBL	Isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	0	0	3	0	3,3	-1,6
DLD	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member10	0	0	3	0	3,3	-1,6
IARS2	Acyl-CoA dehydrogenase family, member 11	0	0	3	0	3,3	-1,6
DNAJC10	Cartilage associated protein	0	0	3	0	3,3	-1,6
ACAD11	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme	0	0	3	0	3,3	-1,6
CRTAP	Importin-4	0	0	3	0	3,3	-1,6
UCHL5	T-cell, immune regulator 1, ATPase	0	0	3	0	3,3	-1,6
IPO4	Glutathione peroxidase	0	0	3	0	3,3	-1,6
TCIRG1	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting	0	0	3	0	3,3	-1,6
GPX8	LAMC1 laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	0	0	3	0	3,3	-1,6
SPAG9	FK506 binding protein 10	0	0	3	0	3,3	-1,6
LAMC1	Signal transducer and activator of transcription	1	9	3	0	3,3	-7,1
FKBP10	Signal recognition particle RNA	0	0	13	3	3,2	-1,6
STAT3	Protein S100-A4 (Metastasin)	0	0	6	1	3,1	-1,6
SPR	6-phosphofructokinase (EC 2.7.1.11)	0	0	6	1	3,1	-1,6
S100A4	S100 calcium-binding protein A4	0	0	6	1	3,1	-1,6

PFKP	Phosphofructokinase, platelet	3	0	15	4	3,0	2,2
MYOF	Myoferlin	37	12	38	12	2,8	1,9
LOC477558	Glutathione S-transferase theta-1-like	0	0	8	2	2,7	-1,6
C4A	Complement component 4a	0	0	8	2	2,7	-1,6
ABCB1	P-glycoprotein	21	8	5	1	2,7	1,6
GLG1	Golgi apparatus protein 1 (CFR-1)	0	0	5	1	2,7	-1,6
PRPSAP2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase	0	0	5	1	2,7	-1,6
LOC506828	Alpha-2-macroglobulin	0	0	5	1	2,7	-1,6
AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1	0	0	5	1	2,7	-1,6
HSPG2	HSPG2 heparan sulfate proteoglycan 2	0	15	5	1	2,7	-20,3
ANXA5	Annexin	24	3	32	11	2,6	3,8
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	0	0	13	4	2,6	-1,6
KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	52	22	56	20	2,6	1,5
CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	5	0	34	12	2,6	3,2
0		0	0	18	6	2,5	-1,6
KIF5B	kinesin family member 5B	4	0	10	3	2,5	2,7
SRPR	Signal recognition particle receptor subunit	0	0	10	3	2,5	-1,6
SEC23A	Protein transport protein Sec23A	0	0	10	3	2,5	-1,6
SERPINA3-2	Serpin A3-2	0	2	10	3	2,5	-4,0
RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	15	0	2	0	2,5	8,4
PTK7	Protein tyrosine kinase 7 (inactive)	6	0	2	0	2,5	3,7
ITCH	E3 ubiquitin-protein ligase (EC 6.3.2.-)	6	0	2	0	2,5	3,7
HRNR	Hornerin	4	0	2	0	2,5	2,7
GPC1	GPC1 - Glypican-1 precursor	3	0	2	0	2,5	2,2
EFR3A	Protein EFR3 homolog A (Protein EFR3-like)	2	0	2	0	2,5	1,7
LRRC8A	Leucine-rich repeat-containing protein 8A	2	0	2	0	2,5	1,7
0	DLA class I histocompatibility antigen, A9/A9	10	4	2	0	2,5	1,4
ATP6V1C1	Alpha-S1-casein (allergen Bos d 8)	0	0	2	0	2,5	-1,6
CSN1S1	Protein transport protein Sec61 subunit alpha	0	0	2	0	2,5	-1,6
SEC61A1	isoform 1 (Sec61 alpha-1)	0	0	2	0	2,5	-1,6
DPYD	SEC61A1 Sec61 alpha 1 subunit	0	0	2	0	2,5	-1,6
CALD1	Caldesmon (CDM)	0	0	2	0	2,5	-1,6
APP	Amyloid beta A4 protein (ABPP)	0	0	2	0	2,5	-1,6
GBAS	Protein NipSnap homolog 2 (NipSnap2)	0	0	2	0	2,5	-1,6
DYNC1H1	DYNC1H1 dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	7	1	51	19	2,5	2,4
NQO1	NQO1 NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	8	0	25	9	2,5	4,8
PITRM1	Pitriysin metalloproteinase 1	0	0	7	2	2,4	-1,6
SSB	Sjogren syndrome antigen B	0	0	12	4	2,4	-1,6
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	0	0	12	4	2,4	-1,6
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein	7	0	32	12	2,4	4,3
SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor H1	0	0	29	11	2,4	-1,6
SERPINB6	Serpin peptidase inhibitor, clade B	4	0	14	5	2,3	2,7
TLN1	Talin 1	28	6	48	19	2,3	2,6
ALDH6A1	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0	0	9	3	2,3	-1,6
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated	0	0	16	6	2,3	-1,6
SLC25A3	Solute carrier family 25, mitochondrial	0	4	16	6	2,3	-6,5
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	4	0	4	1	2,2	2,7
ETFB	Electron-transfer-flavoprotein	0	0	4	1	2,2	-1,6
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0	0	4	1	2,2	-1,6
UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	0	0	4	1	2,2	-1,6
ADK	Adenylate kinase	0	0	4	1	2,2	-1,6
PRKACB	cAMP-dependent protein kinase	0	0	4	1	2,2	-1,6
CFB	CTF transcription factor/nuclear factor 1	0	0	4	1	2,2	-1,6
NANS	N-acetylneuraminic acid synthase	0	0	4	1	2,2	-1,6
AFP	Alpha-fetoprotein (Alpha-1-fetoprotein)	0	0	13	5	2,2	-1,6
LGALS3	Galectin-3 (Gal-3) (35 kDa lectin)	3	1	24	10	2,2	1,2
PHB	Prohibitin	0	4	15	6	2,1	-6,5
CPNE1	Copine-1 (Copine I)	7	0	6	2	2,1	4,3
ITGA3	Integrin, alpha 3	39	15	6	2	2,1	1,6
KARS	Lysine--tRNA ligase (EC 6.1.1.6)	0	0	6	2	2,1	-1,6
ECHS1	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1	0	0	6	2	2,1	-1,6
ARL1	ADP-ribosylation factor-like protein 1	0	0	6	2	2,1	-1,6
NPM1	Nucleophosmin (NPM)	0	0	8	3	2,1	-1,6
PGM1	Phosphoglucomutase 1	0	0	8	3	2,1	-1,6
LGALS1	Galectin	2	0	12	5	2,0	1,7
DPYSL3	Dihydropyrimidinase-like 3	10	0	18	8	2,0	5,8
HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha	0	0	22	10	2,0	-1,6
FN1	Fibronectin (Fragment)	9	35	65	31	2,0	-5,6
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9)	29	18	27	13	1,9	1,0
NPEPPS	Puromycin-sensitive aminopeptidase	8	0	19	9	1,9	4,8
HYOU1	Hypoxia up-regulated 1	0	0	11	5	1,9	-1,6

ETFA	Electron Transfer Flavoprotein Alpha-Subunit2	0	0	11	5	1,9	-1,6
UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	0	0	9	4	1,9	-1,6
RRBP1	Ribosome-binding protein 1 (180 kDa ribosome	0	0	9	4	1,9	-1,6
PSMC1	26S protease regulatory subunit 4 (P26s4)	0	0	9	4	1,9	-1,6
SLC25A12	Calcium-binding mitochondrial carrier protein	0	0	9	4	1,9	-1,6
CAPZA2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	5	1	7	3	1,9	1,8
NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S	0	0	7	3	1,9	-1,6
BCAP31	BCAP31 B-cell receptor-associated protein 31	1	0	5	2	1,8	1,2
NDUF53	ADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	0	0	5	2	1,8	-1,6
DLST	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase	0	0	5	2	1,8	-1,6
DAD1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein	0	0	5	2	1,8	-1,6
SLC44A1	Solute carrier family 44	17	4	3	1	1,8	2,2
ARL8B	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	2	0	3	1	1,8	1,7
AP2M1	AP-2 complex subunit mu (AP-2 mu chain)	1	0	3	1	1,8	1,2
ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	0	0	3	1	1,8	-1,6
DDX18	ATP-dependent RNA helicase DDX18	0	0	3	1	1,8	-1,6
SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9-like	0	0	3	1	1,8	-1,6
OPA1	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	0	0	3	1	1,8	-1,6
UMPS	Uridine monophosphate synthetase	0	0	3	1	1,8	-1,6
NDUFA4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha	0	0	3	1	1,8	-1,6
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)	10	10	3	1	1,8	-1,6
LOC100855913	Myeloid-associated differentiation marker	0	1	3	1	1,8	-2,8
SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	0	0	16	8	1,8	-1,6
GARS	Glycyl-tRNA synthetase	8	1	29	15	1,8	2,7
SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	0	1	23	12	1,8	-2,8
EXOC6B	Exocyst complex component 6B	3	0	1	0	1,7	2,2
ATP1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase	2	0	1	0	1,7	1,7
NPC1	NADPH--cytochrome P450 reductase	2	0	1	0	1,7	1,7
CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	2	0	1	0	1,7	1,7
LLGL1	Lethal Giant Larvae Homolog 1	4	1	1	0	1,7	1,5
SLC4A7	Sodium bicarbonate cotransporter 3	6	2	1	0	1,7	1,4
OXSRI	OXSRI oxidative stress responsive 1	1	0	1	0	1,7	1,2
VIM	Vimentin	17	9	128	71	1,7	1,1
LOC100856570	Phosphoribosylamine glycine ligase	0	0	17	9	1,7	-1,6
GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB	0	0	24	13	1,7	-1,6
ERO1L	ERO1-like protein alpha precursor	0	0	8	4	1,7	-1,6
DBNL	Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal	0	0	8	4	1,7	-1,6
ASNS	Asparagine synthetase (EC 6.3.5.4)	0	0	20	11	1,7	-1,6
CORO1C	Coronin-1C (Coronin-3) (hCRNN4)	3	0	6	3	1,6	2,2
ARPC1B	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1B	5	3	6	3	1,6	-1,1
SERPINA3-7	Endopin 2	0	0	6	3	1,6	-1,6
SUCLG2	Succinate-CoA ligase, GDP-forming	0	0	6	3	1,6	-1,6
PAK2	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	0	0	6	3	1,6	-1,6
RPL19	60S ribosomal protein L19	0	2	6	3	1,6	-4,0
PSMC3	Proteasome (prosome, macropain) 26S	0	0	11	6	1,6	-1,6
CAD	Dihydroorotase domain of human	0	0	14	8	1,6	-1,6
PTRF	Polymerase I and transcript release factor	5	4	22	13	1,6	-1,3
GPI	Glycophosphatidylinositol	9	0	35	21	1,6	5,3
HDLBP	HDLBP high density lipoprotein binding protein	0	0	17	10	1,6	-1,6
MYH9	Myosin-9 (Myosin heavy chain 9)	8	36	128	79	1,5	-6,3
PAFAH1B3	Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b	2	0	4	2	1,5	1,7
AKR1B1	AKR1B1 aldo-keto reductase family 1, member	0	0	4	2	1,5	-1,6
EMC3	ER membrane protein complex subunit 3	0	0	4	2	1,5	-1,6
SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	0	0	4	2	1,5	-1,6
CRK	Adapter molecule crk (Proto-oncogene c-Crk)	0	0	4	2	1,5	-1,6
HNRNP3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	0	0	4	2	1,5	-1,6
HSDL2	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2	0	0	4	2	1,5	-1,6
TPD52L2	Tumor protein D52-like 2	0	0	4	2	1,5	-1,6
TJP2	Tight junction protein ZO-2	0	1	4	2	1,5	-2,8
PC	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)	0	0	28	17	1,5	-1,6
ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium	7	0	23	14	1,5	4,3
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78)	19	11	72	45	1,5	1,1
SLC25A13	Calcium-binding mitochondrial carrier protein	0	0	15	9	1,5	-1,6
RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform (SCR10)	1	3	15	9	1,5	-2,9
A2M	Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M)	15	9	37	23	1,5	1,0
SLC25A6	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier	0	2	18	11	1,5	-4,0
BLVRA	Biliverdin reductase A precursor	0	0	7	4	1,5	-1,6
C14orf166	UPF0568 protein C14orf166 (CLE7 homolog)	0	0	7	4	1,5	-1,6
UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme	0	0	7	4	1,5	-1,6
LOC100855541	ATP5O	0	1	7	4	1,5	-2,8
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	82	47	77	49	1,5	1,1

HK1	Hexokinase-1	0	0	10	6	1,5	-1,6
TPT1	Translationally-controlled tumor protein (TCTP)	0	0	10	6	1,5	-1,6
ATP6V1B2	V-type proton ATPase subunit B	0	0	10	6	1,5	-1,6
GLUD1	Glutamate dehydrogenase (Fragment)	0	0	30	19	1,5	-1,6
ARCN1	Coatomer subunit delta (Archain)	0	0	13	8	1,5	-1,6
RPS18	40S ribosomal protein S18	3	0	19	12	1,5	2,2
FLNA	Filamin-A	28	21	57	37	1,5	-1,2
MVP	Major Vault Protein	13	0	22	14	1,5	7,4
G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	6	0	26	17	1,4	3,7
STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI1)	0	0	11	7	1,4	-1,6
LARS	leucyl-tRNA synthetase	0	0	11	7	1,4	-1,6
FAM49B	Protein FAM49B	8	0	8	5	1,4	4,8
UTRN	Utrophin	3	0	8	5	1,4	2,2
ETF1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit	1	0	8	5	1,4	1,2
PRDX6	Peroxioredoxin 6	0	0	8	5	1,4	-1,6
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0	0	8	5	1,4	-1,6
PTGR1	Prostaglandin reductase 1	13	0	30	20	1,4	7,4
BSG	Basigin	16	10	5	3	1,4	-1,0
PSMC5	26S protease regulatory subunit 8	0	0	5	3	1,4	-1,6
CNDP2	Dipeptidase 2	0	0	5	3	1,4	-1,6
MATR3	Matrin-3	0	0	5	3	1,4	-1,6
ME1	Malic enzyme	0	0	5	3	1,4	-1,6
DPM1	Dolichol-phosphate mannosyltransferase	0	0	5	3	1,4	-1,6
IMPA1	Inositol(Myo)-1(Or 4)-Monophosphatase 1	0	0	5	3	1,4	-1,6
PARVA	Alpha-parvin (Actopaxin) (CH-ILKBP)	0	0	5	3	1,4	-1,6
CTPS1	CTP synthase (EC 6.3.4.2)	0	0	5	3	1,4	-1,6
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	4	0	21	14	1,4	2,7
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	12	8	21	14	1,4	-1,1
MSN	Moesin	46	34	37	25	1,4	-1,2
ALB	ALB protein	27	27	79	54	1,4	-1,6
DARS	Aspartyl-tRNA synthetase	2	0	18	12	1,4	1,7
RAP2B	Ras-related protein Rap-2b	8	0	2	1	1,4	4,8
CPNE3	Copine III	1	0	2	1	1,4	1,2
RSU1	Ras suppressor protein 1 (RSP-1) (Rsu-1)	0	0	2	1	1,4	-1,6
NRBP1	Nuclear receptor-binding protein	0	0	2	1	1,4	-1,6
ABCD3	ABCD3 ATP-binding cassette, sub-family D	0	0	2	1	1,4	-1,6
SARNP	SAP domain-containing ribonucleoprotein	0	0	2	1	1,4	-1,6
DGKA	Diacylglycerol kinase	0	0	2	1	1,4	-1,6
NUDCD1	NudC domain containing 1	0	0	2	1	1,4	-1,6
NUDT5	ADP-sugar pyrophosphatase	0	0	2	1	1,4	-1,6
SPTLC1	Serine palmitoyltransferase	0	0	2	1	1,4	-1,6
PMPCB	Mitochondrial-processing peptidase subunit	0	0	2	1	1,4	-1,6
FAR1	Fatty acyl-CoA reductase 1 (EC 1.2.1.n2)	0	0	2	1	1,4	-1,6
PKM	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	17	10	56	39	1,4	1,0
37500	Septin-2	3	0	9	6	1,4	2,2
BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	2	0	9	6	1,4	1,7
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	15	9	16	11	1,3	1,0
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	0	7	20	14	1,3	-10,3
YWHAH	14-3-3 protein eta	8	1	13	9	1,3	2,7
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	6	2	24	17	1,3	1,4
PICALM	Phosphatidylinositol-binding	1	0	6	4	1,3	1,2
AKR1A1	AKR1A1 aldo-keto reductase family 1, member	0	0	6	4	1,3	-1,6
SARS	Seryl-tRNA synthetase	0	0	6	4	1,3	-1,6
COPZ1	Coatomer subunit zeta-1 (Zeta-1-coat protein)	0	0	6	4	1,3	-1,6
PLOD1	Procollagen-lysine	0	0	6	4	1,3	-1,6
LOC100856598	NAMPT	0	0	6	4	1,3	-1,6
EIF2B1	Eukaryotic translation initiation factor 2B	0	0	6	4	1,3	-1,6
RAB1A	Ras-related protein Rab-1A	12	4	17	12	1,3	1,6
ALB	Serum albumin (BSA) (allergen Bos d 6)	28	35	88	64	1,3	-1,9
RAB7A	Ras-related protein Rab-7 <sup>a</sup>	9	1	10	7	1,3	2,9
FAM129B	Target of the MAP kinase (Erk1/2)	7	4	10	7	1,3	1,0
TXNDC5	Thioredoxin domain containing 5	0	0	10	7	1,3	-1,6
EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3	0	0	10	7	1,3	-1,6
CLIC1	CLIC1 - Chloride intracellular channel protein 1	5	10	10	7	1,3	-2,8
ALB	Serum albumin	2	85	10	7	1,3	-42,6
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10)	45	32	33	24	1,3	-1,1
PSMD13	26S proteasome non-ATPase regulatory	0	0	18	13	1,3	-1,6
MYO1C	Unconventional myosin-Ic	41	1	26	19	1,3	12,2
NME2	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	4	0	19	14	1,3	2,7
RPN1	Ribophorin I	14	5	15	11	1,3	1,6
ACTR1A	Alpha-centractin (Centractin) (ARP1)	4	0	11	8	1,3	2,7

CAPN2	Calpain-2 catalytic subunit precursor	0	0	11	8	1,3	-1,6
DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	0	1	11	8	1,3	-2,8
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding	0	0	7	5	1,3	-1,6
RPL22	60S ribosomal protein L22	0	0	7	5	1,3	-1,6
BLVRB	Flavin reductase (NADPH)	0	0	7	5	1,3	-1,6
OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1 (EC 3.4.19.12)	0	0	7	5	1,3	-1,6
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	0	0	7	5	1,3	-1,6
ACSL4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 (EC 6.2.1.3)	3	3	7	5	1,3	-1,6
MDH2	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	0	1	20	15	1,3	-2,8
LOC100688143	CD44 antigen	15	5	3	2	1,3	1,7
EEF1E1	Eukaryotic translation elongation factor 1	2	0	3	2	1,3	1,7
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	6	4	3	2	1,3	-1,1
RPL23A	60S ribosomal protein L23a	0	0	3	2	1,3	-1,6
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3	0	0	3	2	1,3	-1,6
RPL36	60S ribosomal protein L36	0	0	3	2	1,3	-1,6
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	0	0	3	2	1,3	-1,6
RPS20	40S ribosomal protein S20	0	0	3	2	1,3	-1,6
NNT	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0	0	3	2	1,3	-1,6
BYSL	Bystin	0	0	3	2	1,3	-1,6
CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3	0	0	3	2	1,3	-1,6
DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	0	0	3	2	1,3	-1,6
AASDHPPT	L-aminoacidopate-semialdehyde dehydrogenase	0	0	3	2	1,3	-1,6
MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	0	0	3	2	1,3	-1,6
SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin (Alpha-1-antitrypsin)	9	5	42	32	1,2	1,1
OLA1	Olg-like ATPase 1	3	0	12	9	1,2	2,2
NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	2	0	12	9	1,2	1,7
P4HA2	Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	0	0	12	9	1,2	-1,6
LMNA	Lamin A/C	0	0	61	47	1,2	-1,6
ACTN1	Actinin, alpha 1	22	11	70	54	1,2	1,2
COPA	Coatomer subunit alpha	2	0	30	23	1,2	1,7
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2	0	17	13	1,2	1,7
NAPA	Alpha-Snap	8	0	8	6	1,2	4,8
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	5	0	8	6	1,2	3,2
ATL3	Atlastin GTPase 3	4	0	8	6	1,2	2,7
38961	Septin-6	4	0	8	6	1,2	2,7
IMPDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	2	0	8	6	1,2	1,7
GSTO1	Glutathione S-transferase	0	0	8	6	1,2	-1,6
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1	0	0	8	6	1,2	-1,6
RPL9	60S ribosomal protein L9	0	0	8	6	1,2	-1,6
RUVEL1	RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12)	2	0	13	10	1,2	1,7
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel	0	0	13	10	1,2	-1,6
PSMA6	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	0	0	13	10	1,2	-1,6
PGK1	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	10	2	23	18	1,2	2,2
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	0	0	33	26	1,2	-1,6
TAGLN2	Transgelin-2 (Epididymis tissue protein Li 7e)	14	5	29	23	1,2	1,6
0	Uncharacterized protein	2	0	14	11	1,2	1,7
COPB2	Coatomer subunit beta' (Beta'-coat protein)	0	0	14	11	1,2	-1,6
PSMC6	26S protease regulatory subunit 10B	0	0	14	11	1,2	-1,6
APOA1	Apolipoprotein A-I (Apo-AI) (ApoA-I)	3	0	9	7	1,2	2,2
RPL10	60S ribosomal protein L10	0	0	9	7	1,2	-1,6
PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1	0	0	9	7	1,2	-1,6
RPL15	60S ribosomal protein L15	0	0	9	7	1,2	-1,6
TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	0	0	9	7	1,2	-1,6
RPL3	Ribosomal protein L3	0	5	9	7	1,2	-7,8
RRAS	Ras-related protein R-Ras (p23)	11	1	4	3	1,2	3,5
RRAS2	Ras-related protein R-Ras2	13	3	4	3	1,2	2,2
SQSTM1	Sequestosome-1	5	1	4	3	1,2	1,8
TNPO1	Transportin-1 (Importin beta-2)	2	0	4	3	1,2	1,7
ARF6	ADP-ribosylation factor 6	7	2	4	3	1,2	1,6
CAV1	Caveolin-1	4	1	4	3	1,2	1,5
PON2	Serum paraoxonase/arylesterase 2	1	0	4	3	1,2	1,2
SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	0	0	4	3	1,2	-1,6
PSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory	0	0	4	3	1,2	-1,6
AGT	Angiotensinogen	0	0	4	3	1,2	-1,6
ARMC10	Armadillo repeat containing 10	0	0	4	3	1,2	-1,6
RTCB	tRNA-splicing ligase RtcB homolog (EC 6.5.1.3)	0	0	4	3	1,2	-1,6
SKIV2L2	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	0	0	4	3	1,2	-1,6
CALM	Calmodulin (CaM)	0	0	4	3	1,2	-1,6
DNM1L	Dynamin-1-like protein (EC 3.6.5.5)	0	0	4	3	1,2	-1,6
CMPK1	Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1	0	0	4	3	1,2	-1,6
SEC22B	Vesicle-trafficking protein SEC22b	0	0	4	3	1,2	-1,6

GNPNAT1	Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1	0	0	4	3	1,2	-1,6
ARHGDI1A	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Rho GDI 1)	5	2	20	16	1,2	1,2
NCL	Nucleolin	0	0	20	16	1,2	-1,6
COPG1	Coatomeer subunit gamma	3	0	15	12	1,2	2,2
SYNCRIP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	2	0	15	12	1,2	1,7
EIF2S3	translation initiation factor 2 subunit 3	1	0	10	8	1,2	1,2
USP5	Ubiquitin isopeptidase T (Fragment)	0	0	10	8	1,2	-1,6
DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	4	0	11	9	1,1	2,7
RPS15A	40S ribosomal protein S15a	0	0	11	9	1,1	-1,6
HIST2H2AC	Histone H2A type 2-C	4	8	11	9	1,1	-2,7
DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)	6	0	5	4	1,1	3,7
PSMA5	Proteasome subunit alpha type-5 (EC 3.4.25.1)	4	0	5	4	1,1	2,7
SERPINC1	Antithrombin-III	0	0	5	4	1,1	-1,6
NUP155	Nucleoporin 155kDa	0	0	5	4	1,1	-1,6
DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	0	0	5	4	1,1	-1,6
CSNK2A1	Casein kinase II subunit alpha (CK II alpha)	0	0	5	4	1,1	-1,6
PSMB6	Proteasome subunit beta type-6 (EC 3.4.5.1)	0	0	5	4	1,1	-1,6
USO1	Cytoskeleton-related gene, uso1,	0	0	5	4	1,1	-1,6
PSMB1	Proteasome subunit beta type-1 (EC 3.4.25.1)	0	0	5	4	1,1	-1,6
FUBP1	Far upstream element-binding protein 1	0	0	5	4	1,1	-1,6
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	0	0	5	4	1,1	-1,6
SRP68	Signal recognition particle subunit SRP68	0	0	5	4	1,1	-1,6
GOLT1B	Vesicle transport protein GOT1B	0	0	5	4	1,1	-1,6
NXN	Nucleoredoxin (EC 1.8.1.8)	0	0	5	4	1,1	-1,6
OSTF1	Osteoclast-stimulating factor 1	0	0	5	4	1,1	-1,6
FH	Fumarate hydratase	0	0	5	4	1,1	-1,6
CANX	Calnexin (pp90)	2	0	24	20	1,1	1,7
KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	19	2	12	10	1,1	4,0
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide	4	0	12	10	1,1	2,7
YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5	13	7	19	16	1,1	1,1
EPRS	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	0	0	19	16	1,1	-1,6
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	0	2	19	16	1,1	-4,0
ANXA11	Annexin	20	5	13	11	1,1	2,2
SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	0	0	13	11	1,1	-1,6
DRG1	Developmentally-regulated GTP-binding	0	0	13	11	1,1	-1,6
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	0	0	13	11	1,1	-1,6
ENO1	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11)	14	6	35	30	1,1	1,4
ANXA4	Annexin	10	0	6	5	1,1	5,8
ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	4	0	6	5	1,1	2,7
ITGAV	Integrin, alpha V	24	5	6	5	1,1	2,6
FLII	Flightless I actin binding protein	1	0	6	5	1,1	1,2
GNAI3	Guanine nucleotide binding protein (G protein)	11	6	6	5	1,1	1,1
COX4I1	Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	0	0	6	5	1,1	-1,6
API5	Apoptosis inhibitor 5	0	0	6	5	1,1	-1,6
ACO1	Aconitase 1, soluble	0	0	6	5	1,1	-1,6
ERP29	Endoplasmic reticulum protein 29	0	0	6	5	1,1	-1,6
RPS26	40S ribosomal protein S26	0	0	6	5	1,1	-1,6
TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	0	0	6	5	1,1	-1,6
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	1	0	14	12	1,1	1,2
UBC	Polyubiquitin-C [Cleaved into: Ubiquitin-related	28	16	14	12	1,1	1,1
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0	0	14	12	1,1	-1,6
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3	0	0	15	13	1,1	-1,6
ALDH18A1	Aldehyde dehydrogenase 18 family	0	0	15	13	1,1	-1,6
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	70	30	7	6	1,1	1,5
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	0	0	7	6	1,1	-1,6
HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	0	0	7	6	1,1	-1,6
0	Uncharacterized protein	0	0	7	6	1,1	-1,6
THOP1	Thimet oligopeptidase 1	0	0	7	6	1,1	-1,6
UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein	0	0	7	6	1,1	-1,6
ST13	Heat shock 70kD protein binding protein	3	4	7	6	1,1	-1,9
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	0	0	16	14	1,1	-1,6
TUBB6	Tubulin, beta 6 class V	11	19	44	39	1,1	-2,6
PABPC1	Polyadenylate-binding protein 1 (PABP-1)	5	2	17	15	1,1	1,2
HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	1	0	8	7	1,1	1,2
STRAP	Serine-threonine kinase receptor	0	0	8	7	1,1	-1,6
BAX	Apoptosis regulator BAX	0	0	8	7	1,1	-1,6
BZW2	Basic leucine zipper and W2	0	0	8	7	1,1	-1,6
TPI1	Triosephosphate isomerase (TIM) (EC 5.3.1.1)	13	1	27	24	1,1	4,1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10	12	28	25	1,1	-1,8
AP2A2	AP-2 complex subunit alpha-2	5	0	9	8	1,1	3,2
ORM1	Orosomucoid 1	2	0	9	8	1,1	1,7



AIFM1	Alpha-1-acid glycoprotein (Orosomucoid)	0	0	9	8	1,1	-1,6
ITGB1	Integrin beta	22	23	9	8	1,1	-1,6
TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	11	9	40	36	1,1	-1,3
ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase	61	40	20	18	1,1	-1,0
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	0	0	20	18	1,1	-1,6
PRDX1	Peroxiredoxin 1	11	5	32	29	1,1	1,3
GC	Vitamin D-binding protein (DBP) (VDB)	2	0	10	9	1,1	1,7
PSMC2	26S protease regulatory subunit 7	0	0	10	9	1,1	-1,6
ACTB	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	46	85	68	62	1,0	-2,9
VCL	Vinculin	14	8	24	22	1,0	1,1
EIF3B	Eukaryotic translation initiation factor 3	1	0	12	11	1,0	1,2
ATP5B	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	0	11	52	48	1,0	-15,3
0	Uncharacterized protein	13	7	39	36	1,0	1,1
PFN1	PFN1 profilin 1	12	4	27	25	1,0	1,6
RAB2A	Ras-related protein Rab-2 <sup>a</sup>	17	2	13	12	1,0	3,6
ANXA8L1	Annexin	25	0	28	26	1,0	13,6
CLTC	Clathrin heavy chain 1	26	6	73	68	1,0	2,4
TUBB2A	Tubulin beta-2A chain (Tubulin beta class IIa)	19	36	59	55	1,0	-2,9
RPS9	40S ribosomal protein S9	3	2	14	13	1,0	-1,2
TF	Serotransferrin	0	0	45	42	1,0	-1,6
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	91	68	77	72	1,0	-1,2
VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	7	0	16	15	1,0	4,3
RPS8	40S ribosomal protein S8	4	5	16	15	1,0	-1,9
DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	0	4	17	16	1,0	-6,5
CCT7	T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta)	4	3	18	17	1,0	-1,3
MYBBP1A	Myb-binding protein 1 <sup>a</sup>	0	0	19	18	1,0	-1,6
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	13	18	40	38	1,0	-2,1
PDIA3	PDIA3 protein disulfide isomerase family A	2	0	44	42	1,0	1,7
EEF2	Elongation factor 2 (EF-2)	9	8	35	34	-1,0	-1,4
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	18	5	39	38	-1,0	2,0
HSP90B1	Endoplasmin	7	7	45	44	-1,0	-1,6
FLOT1	Flotillin 1	18	0	0	0	-1,0	10,0
DPP4	Dipeptidil peptidase-4	15	0	0	0	-1,0	8,4
PLCD1	Phospholipase C, delta 1	15	0	0	0	-1,0	8,4
EPHB2	Ephrin type-B receptor 2 (EC 2.7.10.1)	14	0	0	0	-1,0	7,9
MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase	12	0	0	0	-1,0	6,8
RALA	Ras related v-ral simian leukemia viral	12	0	0	0	-1,0	6,8
FLOT2	Flotillin-2 (Epidermal surface antigen) (ESA)	11	0	0	0	-1,0	6,3
IGSF8	Immunoglobulin superfamily member 8	10	0	0	0	-1,0	5,8
RAB13	Ras-related protein Rab-13	10	0	0	0	-1,0	5,8
RAB8B	Ras-related protein Rab-8	8	0	0	0	-1,0	4,8
PROCR	Endothelial protein C receptor	7	0	0	0	-1,0	4,3
CD151	CD151 antigen (CD antigen CD151)	7	0	0	0	-1,0	4,3
RALB	Ras-related protein Ral-B precursor	7	0	0	0	-1,0	4,3
RAB35	Ras-related protein Rab-35	7	0	0	0	-1,0	4,3
HAS2	Hyaluronan synthase 2 (EC 2.4.1.212)	6	0	0	0	-1,0	3,7
PVR	PVR poliovirus receptor	6	0	0	0	-1,0	3,7
ZDHHC5	Palmitoyltransferase ZDHHC5 (EC 2.3.1.225)	6	0	0	0	-1,0	3,7
PTPRA	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase	5	0	0	0	-1,0	3,2
PI4KA	PI4KA phosphatidylinositol 4-kinase	5	0	0	0	-1,0	3,2
CDPC1	CUB domain-containing protein 1	5	0	0	0	-1,0	3,2
IST1	IST1 homolog (hIST1)	5	0	0	0	-1,0	3,2
SLC5A3	Sodium/myo-inositol cotransporter	5	0	0	0	-1,0	3,2
STX7	Syntaxin-7	5	0	0	0	-1,0	3,2
TTYH3	TTYH3 tweety family member 3	9	1	0	0	-1,0	2,9
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1	4	0	0	0	-1,0	2,7
DNASE1L1	Deoxyribonuclease	4	0	0	0	-1,0	2,7
TOLLIP	Toll interacting protein	4	0	0	0	-1,0	2,7
TPBG	trophoblast glycoprotein precursor	4	0	0	0	-1,0	2,7
EVA1A	Eva-1 homolog A	4	0	0	0	-1,0	2,7
CPD	Carboxypeptidase D (EC 3.4.17.22)	4	0	0	0	-1,0	2,7
PIPSL	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein	4	0	0	0	-1,0	2,7
NRP2	Neuropilin-2	4	0	0	0	-1,0	2,7
STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	4	0	0	0	-1,0	2,7
EFNB1	Ephrin-B1	8	1	0	0	-1,0	2,7
FARP1	FERM, RhoGEF and pleckstrin	3	0	0	0	-1,0	2,2
GOLGA7	Golgin subfamily A member 7	3	0	0	0	-1,0	2,2
SLC7A1	High affinity cationic amino acid transporter 1	3	0	0	0	-1,0	2,2
NEDD4	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4 (EC 6.3.2.-)	3	0	0	0	-1,0	2,2
TAOK3	Serine/threonine-protein kinase TAO3	3	0	0	0	-1,0	2,2
CNP	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	6	1	0	0	-1,0	2,1

SERINC1	Serine incorporator 1	6	1	0	0	-1,0	2,1
LYN	Tyrosine-protein kinase	5	1	0	0	-1,0	1,8
0	Uncharacterized protein (Fragment)	5	1	0	0	-1,0	1,8
EDIL3	Edil3 EGF-like repeats and discoidin I-like	46	16	0	0	-1,0	1,8
ANO6	Anoctamin (Fragment)	2	0	0	0	-1,0	1,7
TSPAN3	Tetraspanin-3 (Tspan-3) (Tetraspanin TM4-A)	2	0	0	0	-1,0	1,7
NCR3LG1	Natural killer cell cytotoxicity receptor 3 ligand	2	0	0	0	-1,0	1,7
RHEB	GTP-binding protein Rheb	2	0	0	0	-1,0	1,7
SERINC3	Serine incorporator 3	2	0	0	0	-1,0	1,7
ATP6V0D1	V-type proton ATPase subunit d 1	2	0	0	0	-1,0	1,7
0	Integrin beta	10	4	0	0	-1,0	1,4
ENTPD3	Ectonucleoside triphosphate	12	5	0	0	-1,0	1,4
SLC12A2	Na-K-Cl cotransporter	9	4	0	0	-1,0	1,3
LDLR	LDLR low density lipoprotein receptor	7	3	0	0	-1,0	1,3
0	CD47	5	2	0	0	-1,0	1,2
SLC16A3	Monocarboxylate transporter 4	3	1	0	0	-1,0	1,2
ITGB3	Integrin beta (Fragment)	11	6	0	0	-1,0	1,1
KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	15	9	0	0	-1,0	1,0
CHMP4B	Charged multivesicular body protein 4b	7	4	0	0	-1,0	1,0
NRAS	GTPase NRas (Transforming protein N-Ras)	2	1	0	0	-1,0	-1,1
ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase	6	4	0	0	-1,0	-1,1
CD46	CD46 molecule, complement regulatory	6	4	0	0	-1,0	-1,1
SLC6A8	Sodium- and chloride-dependent creatine	3	2	0	0	-1,0	-1,2
VPS37B	Vacuolar protein sorting 37 homolog B	4	3	0	0	-1,0	-1,3
MOB1B	MOB kinase activator 1B (Mob1 homolog 1A)	1	1	0	0	-1,0	-1,6
GJA1	Gap junction protein	4	4	0	0	-1,0	-1,6
PTGFRN	PTGFRN prostaglandin F2 receptor inhibitor	27	32	0	0	-1,0	-1,8
CD63	CD63 protein	2	3	0	0	-1,0	-2,0
TSPAN8	Tetraspanin-8	2	3	0	0	-1,0	-2,0
DNAJA2	DnaJ homolog subfamily A member 2	2	3	0	0	-1,0	-2,0
STOM	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	6	13	0	0	-1,0	-3,1
GLIPR2	Golgi-associated plant pathogenesis-related	2	6	0	0	-1,0	-3,5
STXBP2	Syntaxin-binding protein 2	1	4	0	0	-1,0	-3,6
ARRDC1	Arrestin domain-containing protein 1	3	9	0	0	-1,0	-3,8
PROM2	Prominin 2	0	3	0	0	-1,0	-5,3
CEACAM30	Carcinoembryonic antigen-related	0	3	0	0	-1,0	-5,3
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM)	0	3	0	0	-1,0	-5,3
GPRC5C	G protein-coupled receptor, class C, group 5	0	4	0	0	-1,0	-6,5
MUC1	Mucin 1	0	4	0	0	-1,0	-6,5
IGKC	Ig kappa chain C región	0	6	0	0	-1,0	-9,0
SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	0	6	0	0	-1,0	-9,0
TF	Serotransferrin (Transferrin)	0	7	0	0	-1,0	-10,3
TF	Tissue factor (TF)	0	7	0	0	-1,0	-10,3
HP	Haptoglobin (Zonulin)	0	8	0	0	-1,0	-11,5
LSR	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	0	8	0	0	-1,0	-11,5
IGHA1	Ig alpha-1 chain C región	0	8	0	0	-1,0	-11,5
APOA1	Apolipoprotein A-I (Apo-AI) (ApoA-I)	0	10	0	0	-1,0	-14,0
RACGAP1	RACGAP1 - Rac GTPase-activating protein 1	0	10	0	0	-1,0	-14,0
KIF23	Kinesin-like protein	0	14	0	0	-1,0	-19,0
PRKAA1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic	1	0	1	1	-1,0	1,2
LMAN1	Protein ERGIC-53,ER-Golgi intermediaTE	0	0	1	1	-1,0	-1,6
CTH	Cystathionine gamma-lyase	0	0	1	1	-1,0	-1,6
SHMT1	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	0	0	1	1	-1,0	-1,6
ACADS	Acyl-CoA dehydrogenase	0	0	1	1	-1,0	-1,6
ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenaseE	0	0	1	1	-1,0	-1,6
HEATR1	HEAT repeat containing 1	0	0	1	1	-1,0	-1,6
DBI	Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	0	0	1	1	-1,0	-1,6
PPP2R4	Serine/threonine-protein phosphatase 2A	0	0	1	1	-1,0	-1,6
CDC37	Cell division cycle 37	0	0	1	1	-1,0	-1,6
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (EC 6.3.2.19)	3	0	2	2	-1,0	2,2
GORASP2	Golgi reassembly-stacking protein 2	0	0	2	2	-1,0	-1,6
SDHB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone]	0	0	2	2	-1,0	-1,6
STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	0	0	2	2	-1,0	-1,6
UAP1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	0	0	2	2	-1,0	-1,6
NDUFS7	NADH dehydrogenase	0	0	2	2	-1,0	-1,6
NAGLU	N-acetylglucosaminidase	0	0	2	2	-1,0	-1,6
0	Factor Xlla inhibitor (XllaINH)	0	0	2	2	-1,0	-1,6
AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial (AK 2)	0	0	2	2	-1,0	-1,6
CBX3	Chromobox protein homolog 3 (HECH)	0	0	2	2	-1,0	-1,6
RPL28	60S ribosomal protein L28	0	1	2	2	-1,0	-2,8
CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta (CapZ beta)	0	1	2	2	-1,0	-2,8



GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G(q)	5	0	3	3	-1,0	3,2
MYL12B	Myosin regulatory light chain 12B	1	0	3	3	-1,0	1,2
PSMA4	Proteasome subunit alpha type-4 (EC 3.4.25.1)	0	0	3	3	-1,0	-1,6
EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit1	0	0	3	3	-1,0	-1,6
CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5	0	0	3	3	-1,0	-1,6
SF3A1	Splicing factor 3a, subunit 1	0	0	3	3	-1,0	-1,6
GLRX3	Glutaredoxin-3	0	0	3	3	-1,0	-1,6
PFDN2	Prefoldin subunit 2	0	0	3	3	-1,0	-1,6
RNPEP	Arginyl aminopeptidase	0	0	3	3	-1,0	-1,6
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	0	0	3	3	-1,0	-1,6
RCC1	RCC1 - Regulator of chromosome condensation	0	0	3	3	-1,0	-1,6
UBFD1	Ubiquitin domain-containing protein UBFD1	0	0	3	3	-1,0	-1,6
ARPC5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	0	0	3	3	-1,0	-1,6
RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	0	0	3	3	-1,0	-1,6
SRP54	Signal recognition particle 54 kDa protein	0	0	3	3	-1,0	-1,6
EEF1B2	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	0	0	3	3	-1,0	-1,6
PPP2R5C	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa	0	0	3	3	-1,0	-1,6
RPL27	60S ribosomal protein L27	1	3	3	3	-1,0	-2,9
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAP kinase)	1	0	4	4	-1,0	1,2
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	0	0	4	4	-1,0	-1,6
PTPN12	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type	0	0	4	4	-1,0	-1,6
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	0	0	4	4	-1,0	-1,6
ILF3	Interleukin enhancer binding factor 3	0	0	4	4	-1,0	-1,6
HSD17B10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	0	0	4	4	-1,0	-1,6
DCTN2	Dynactin subunit 2	0	0	4	4	-1,0	-1,6
ILK	Integrin-linked protein kinase (EC 2.7.11.1)	0	0	4	4	-1,0	-1,6
MPST	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST)	0	0	4	4	-1,0	-1,6
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member	0	0	4	4	-1,0	-1,6
RALY	RNA-binding protein	0	0	4	4	-1,0	-1,6
SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein	0	0	4	4	-1,0	-1,6
CD9	CD9 protein	6	10	4	4	-1,0	-2,4
CAPZA1	F-actin capping protein alpha subunit family	6	0	5	5	-1,0	3,7
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	57	22	5	5	-1,0	1,6
FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	4	1	5	5	-1,0	1,5
MDH1	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	1	0	5	5	-1,0	1,2
EH04	EH-domain containing 4	31	26	5	5	-1,0	-1,3
DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	0	0	5	5	-1,0	-1,6
IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	0	0	5	5	-1,0	-1,6
NARS	Asparaginyl-tRNA synthetase	0	0	5	5	-1,0	-1,6
PSMA1	Proteasome subunit alpha type-1 (EC 3.4.25.1)	0	0	5	5	-1,0	-1,6
HARS	Histidyl-tRNA synthetase	0	0	5	5	-1,0	-1,6
MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	0	0	5	5	-1,0	-1,6
TROVE2	SS-A/Ro ribonucleoprotein	0	0	5	5	-1,0	-1,6
KPNA3	Importin subunit alpha-4 (Importin alpha Q2)	0	0	5	5	-1,0	-1,6
USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	0	0	5	5	-1,0	-1,6
BCAT2	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	0	0	5	5	-1,0	-1,6
RPL11	60S ribosomal protein L11	3	5	5	5	-1,0	-2,3
ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	2	0	6	6	-1,0	1,7
ARF4	ADP-ribosylation factor 4	3	2	6	6	-1,0	-1,2
TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta (EC 5.99.1.3)	0	0	6	6	-1,0	-1,6
CS	Citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1)	0	0	6	6	-1,0	-1,6
RPS12	40S ribosomal protein S12	0	0	6	6	-1,0	-1,6
EEF1D	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	0	0	6	6	-1,0	-1,6
ACOT7	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	0	0	6	6	-1,0	-1,6
SET	Protein SET (HLA-DR-associated protein II)	0	0	6	6	-1,0	-1,6
RPL4	60S ribosomal protein L4 (Fragment)	1	1	6	6	-1,0	-1,6
VAT1	VAT1 vesicle amine transport 1	14	0	7	7	-1,0	7,9
HSD17B12	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	1	0	7	7	-1,0	1,2
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	0	0	7	7	-1,0	-1,6
SLC25A11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate	0	0	7	7	-1,0	-1,6
EMC1	EMC1 ER membrane protein complex subunit 1	0	0	7	7	-1,0	-1,6
PSMC4	26S protease regulatory subunit 6B	0	0	7	7	-1,0	-1,6
PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit	0	0	7	7	-1,0	-1,6
ACACA	Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) (EC 6.4.1.2)	0	0	7	7	-1,0	-1,6
ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	0	0	7	7	-1,0	-1,6
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha,	0	0	7	7	-1,0	-1,6
LRRC59	Leucine rich repeat containing 59	0	0	7	7	-1,0	-1,6
RPL12	60S ribosomal protein L12	1	1	7	7	-1,0	-1,6
RPL5	RPL5 ribosomal protein L5	0	2	7	7	-1,0	-4,0
HPRT1	Hypoxanthine-guanine (HGPRTase)	2	0	8	8	-1,0	1,7
EIF3M	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0	0	8	8	-1,0	-1,6

TMED10	Transmembrane emp24 domain-containing	0	0	8	8	-1,0	-1,6
DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	0	0	8	8	-1,0	-1,6
RPL13	60S ribosomal protein L13	0	2	8	8	-1,0	-4,0
RPS25	40S ribosomal protein S25	3	0	9	9	-1,0	2,2
RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein 2	2	0	9	9	-1,0	1,7
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	4	0	10	10	-1,0	2,7
0	cDNA FLJ60713, highly similar to Homo sapiens	0	0	10	10	-1,0	-1,6
VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel	1	2	10	10	-1,0	-2,2
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0	0	11	11	-1,0	-1,6
CARS	CysteinyI-tRNA synthetase	0	0	11	11	-1,0	-1,6
CYB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3 (B5R)	0	0	11	11	-1,0	-1,6
IARS	Isoleucyl-tRNA synthetase	0	0	11	11	-1,0	-1,6
CBR1	Carbonyl reductase 1	0	0	11	11	-1,0	-1,6
CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	4	5	11	11	-1,0	-1,9
CFL1	Cofilin-1 (18 kDa phosphoprotein) (p18)	8	19	11	11	-1,0	-3,4
RAB1B	Ras-related protein Rab-1B	12	0	12	12	-1,0	6,8
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	3	0	12	12	-1,0	2,2
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta (Fragment)	2	0	12	12	-1,0	1,7
RPL7	RPL7 ribosomal protein L7	4	3	12	12	-1,0	-1,3
PSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	0	0	12	12	-1,0	-1,6
ACTR2	Actin-related protein 2 (Actin-like protein 2)	3	0	13	13	-1,0	2,2
IGF2BP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding	0	0	13	13	-1,0	-1,6
TARS	Threonyl-tRNA synthetase	0	0	13	13	-1,0	-1,6
PSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	2	0	15	15	-1,0	1,7
TKT	Transketolase	1	0	16	16	-1,0	1,2
HIST1H2BJ	Histone H2B type 1-J (Histone H2B.1)	0	0	16	16	-1,0	-1,6
LDHB	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	6	4	17	17	-1,0	-1,1
RDX	Radixin	30	21	19	19	-1,0	-1,1
PHB2	Prohibitin 2	0	6	20	20	-1,0	-9,0
CAPG	Capping protein (actin filament), gelsolin-like	11	0	22	22	-1,0	6,3
YWHAE	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	18	6	26	26	-1,0	1,7
ANXA1	Annexin	49	34	50	50	-1,0	-1,1
ANXA2	Annexin A2 (Annexin-2)	76	42	70	71	-1,1	1,2
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	28	24	76	78	-1,1	-1,3
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain (Alpha-tubulin 1)	10	0	34	35	-1,1	5,8
IPO5	Importin-5	2	2	30	31	-1,1	-1,6
LDHA	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	10	9	27	28	-1,1	-1,4
HIST1H2BK	Histone H2B type 1-K (H2B K)	1	3	17	18	-1,1	-2,9
RPLP0	ribosomal protein P0	4	0	16	17	-1,1	2,7
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha	0	16	33	35	-1,1	-21,6
CCT3	T-complex protein 1 subunit gamma	5	4	14	15	-1,1	-1,3
ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	0	0	14	15	-1,1	-1,6
0	Histone H4 (H4.1)	3	7	29	31	-1,1	-3,0
KRT6C	Keratin, type II cytoskeletal 6C (Cytokeratin-6C)	19	5	13	14	-1,1	2,1
RARS	Arginyl-tRNA synthetase	0	0	13	14	-1,1	-1,6
HIST1H1E	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	0	0	13	14	-1,1	-1,6
RPS3A	40S ribosomal protein S3a	0	1	13	14	-1,1	-2,8
GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-	2	0	12	13	-1,1	1,7
MYL6	like	1	0	12	13	-1,1	1,2
ACTN4	Myosin light polypeptide 6	15	23	51	55	-1,1	-2,3
APRT	Alpha-actinin-4	0	0	11	12	-1,1	-1,6
EEF1G	Adenine phosphoribosyltransferase	8	4	23	25	-1,1	1,1
RAB11A	Ras-related protein Rab-11A (Rab-11)	13	7	10	11	-1,1	1,1
RPS7	40S ribosomal protein S7	0	0	10	11	-1,1	-1,6
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	0	0	10	11	-1,1	-1,6
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A (NDK A)	0	0	10	11	-1,1	-1,6
PPP2R1A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa	1	0	9	10	-1,1	1,2
ACTR3	Actin-related protein 3 (Actin-2)	1	0	9	10	-1,1	1,2
AARS	Alanyl-tRNA synthetase	0	0	9	10	-1,1	-1,6
PSMD7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	0	1	9	10	-1,1	-2,8
LOC100683687	60S ribosomal protein L6	1	6	9	10	-1,1	-5,0
RPS10	40S ribosomal protein S10	0	0	8	9	-1,2	-1,6
AHCY	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	0	0	8	9	-1,2	-1,6
NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	0	0	8	9	-1,2	-1,6
GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate	0	0	8	9	-1,2	-1,6
VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel3	0	0	8	9	-1,2	-1,6
WDR1	WD repeat domain 1	4	5	8	9	-1,2	-1,9
FABP3	Fatty acid-binding protein, heart	3	0	7	8	-1,2	2,2
PSMA7	Proteasome subunit alpha type-7 (EC 3.4.25.1)	3	1	7	8	-1,2	1,2
AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1	1	0	7	8	-1,2	1,2
FARSB	Cytoplasmic phenylalanine-tRNA synthetase	0	0	7	8	-1,2	-1,6

RPL35	60S ribosomal protein L35	0	0	7	8	-1,2	-1,6
PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3 (EC 3.4.25.1)	0	0	7	8	-1,2	-1,6
TUFM	Elongation factor Tu	0	0	7	8	-1,2	-1,6
GCN1L1	Translational activator GCN1	0	0	7	8	-1,2	-1,6
LAP3	leucine aminopeptidase 3	0	0	7	8	-1,2	-1,6
ATP5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	0	0	7	8	-1,2	-1,6
RPL38	60S ribosomal protein L38	0	0	7	8	-1,2	-1,6
ACADVL	ACADVL acyl-CoA dehydrogenase	0	0	7	8	-1,2	-1,6
RAB14	Ras-related protein Rab-14	14	0	15	17	-1,2	7,9
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	3	0	15	17	-1,2	2,2
SFN	Stratifin	3	1	15	17	-1,2	1,2
SF3B3	SF3B3 splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	0	0	15	17	-1,2	-1,6
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A)	14	1	21	24	-1,2	4,4
PRDX2	Peroxioredoxin 2	7	0	6	7	-1,2	4,3
PPP2R2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa	2	0	6	7	-1,2	1,7
EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	0	0	6	7	-1,2	-1,6
HMGB1	High mobility group protein B1	0	0	6	7	-1,2	-1,6
PDIA4	Protein disulfide isomerase family A, member 4	0	0	6	7	-1,2	-1,6
HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	0	0	6	7	-1,2	-1,6
PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	0	0	6	7	-1,2	-1,6
ASAH1	Uncharacterized protein (Fragment)	0	0	6	7	-1,2	-1,6
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding	0	0	6	7	-1,2	-1,6
TCF1	T-complex protein 1 subunit alpha	5	6	20	23	-1,2	-1,8
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0	13	46	53	-1,2	-17,8
CCT6A	T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta)	4	0	18	21	-1,2	2,7
YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	16	8	18	21	-1,2	1,2
S100A10	Protein S100-A10 (Calpactin I light chain)	2	1	5	6	-1,2	-1,1
RPL35A	60S ribosomal protein L35a	0	0	5	6	-1,2	-1,6
PSMD4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	0	0	5	6	-1,2	-1,6
AP3B1	AP-3 complex subunit beta-1	0	0	5	6	-1,2	-1,6
ATP6V1A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	0	0	5	6	-1,2	-1,6
UFD1L	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	0	0	5	6	-1,2	-1,6
SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	0	0	5	6	-1,2	-1,6
NSFL1C	NSFL1 cofactor p47 (p97 cofactor p47)	0	0	5	6	-1,2	-1,6
RPS23	40S ribosomal protein S23	1	3	5	6	-1,2	-2,9
HNRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0	0	17	20	-1,2	-1,6
TUBB4A	Tubulin beta-4A chain (Tubulin beta-4 chain)	15	0	40	47	-1,2	8,4
DDX39B	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13)	1	0	10	12	-1,2	1,2
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein (Asialofetuin) (Fetuin-A)	6	3	10	12	-1,2	1,1
RPS3	40S ribosomal protein S3	1	5	21	25	-1,2	-4,3
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i)	24	2	4	5	-1,2	5,0
SSR4	Translocon-associated protein subunit delta	1	0	4	5	-1,2	1,2
PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A	1	0	4	5	-1,2	1,2
GNB1	Guanine nucleotide-binding protein G(i)	4	3	4	5	-1,2	-1,3
ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	0	0	4	5	-1,2	-1,6
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	0	0	4	5	-1,2	-1,6
SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding	0	0	4	5	-1,2	-1,6
XPNPEP1	Xaa-Pro aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.9)	0	0	4	5	-1,2	-1,6
EIF3CL	Eukaryotic translation initiation factor	0	0	9	11	-1,2	-1,6
HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	0	0	9	11	-1,2	-1,6
0	Class IVb beta tubulin	17	36	43	52	-1,3	-3,2
KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	9	4	23	28	-1,3	1,3
COPB1	Coatomer subunit beta (Beta-coat protein)	2	0	13	16	-1,3	1,7
SLC3A2	Solute carrier family 3 member 2	14	12	8	10	-1,3	-1,4
PSMB5	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)	0	0	8	10	-1,3	-1,6
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	3	0	17	21	-1,3	2,2
RPSA	40S ribosomal protein SA	6	5	17	21	-1,3	-1,3
NOP58	Nucleolar protein 58 (Nucleolar protein 5)	0	0	17	21	-1,3	-1,6
HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	3	4	17	21	-1,3	-1,9
RPS13	40S ribosomal protein S13	0	3	12	15	-1,3	-5,3
TUBB5	Tubulin beta-5 chain	17	35	46	57	-1,3	-3,1
ERMP1	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	2	0	3	4	-1,3	1,7
BRI3BP	BRI3 binding protein	1	0	3	4	-1,3	1,2
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	1	0	3	4	-1,3	1,2
CDC42	Cell division control protein 42 homolog	1	0	3	4	-1,3	1,2
0	Histone H3.1	0	0	3	4	-1,3	-1,6
NUDT21	Cleavage and polyadenylation specificity factor	0	0	3	4	-1,3	-1,6
SMU1	WD40 repeat-containing protein SMU1	0	0	3	4	-1,3	-1,6
RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein	0	0	3	4	-1,3	-1,6
MCM6	DNA replication licensing factor MCM6	0	0	3	4	-1,3	-1,6
LOC100855698	PPP1R7 protein phosphatase 1	0	0	3	4	-1,3	-1,6

AMACR	Alpha-methylacyl-CoA racemase	0	0	3	4	-1,3	-1,6
HM13	Minor histocompatibility antigen H13	0	0	3	4	-1,3	-1,6
HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-)	0	0	3	4	-1,3	-1,6
ITPA	Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase)	0	0	3	4	-1,3	-1,6
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit	0	0	3	4	-1,3	-1,6
SNRNPB	Small nuclear ribonucleoprotein-associated	0	0	3	4	-1,3	-1,6
YBX3	Y-box-binding protein 3	0	0	3	4	-1,3	-1,6
RPL31	60S ribosomal protein L31	0	0	3	4	-1,3	-1,6
RPL17	60S ribosomal protein L17	0	0	7	9	-1,3	-1,6
NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit	0	0	7	9	-1,3	-1,6
CKB	Creatine kinase B-type (EC 2.7.3.2) (B-CK)	5	0	11	14	-1,3	3,2
LOC100856197	Uncharacterized protein	0	0	11	14	-1,3	-1,6
RPS2	40S ribosomal protein S2	0	6	11	14	-1,3	-9,0
CCT8	Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	5	2	23	29	-1,3	1,2
PFN1	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a)	3	0	14	18	-1,3	2,2
PREP	Prolyl endopeptidase	3	0	10	13	-1,3	2,2
SNF1	Staphylococcal nuclease domain-containing	1	0	10	13	-1,3	1,2
PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	0	2	10	13	-1,3	-4,0
RPL13A	60S ribosomal protein L13a	2	4	6	8	-1,3	-2,5
XPO1	Exportin-1 (Exp1)	0	0	13	17	-1,3	-1,6
RTN4	Reticulon	9	2	9	12	-1,4	2,0
FUS	RNA-binding protein FUS	0	0	9	12	-1,4	-1,6
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90)	27	20	60	78	-1,4	-1,2
ACLY	ATP citrate lyase	10	2	29	38	-1,4	2,2
PSMB3	Proteasome subunit beta type-3 (EC 3.4.25.1)	1	0	12	16	-1,4	1,2
PLEC	Plectin	10	38	82	107	-1,4	-5,5
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	17	1	2	3	-1,4	5,2
TSG101	ESCRT-I complex subunit TSG101	4	0	2	3	-1,4	2,7
RHOA	Transforming protein RhoA (Rho1)	1	0	2	3	-1,4	1,2
0	Importin subunit alpha	1	0	2	3	-1,4	1,2
ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase	35	19	2	3	-1,4	1,2
ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	0	0	2	3	-1,4	-1,6
GLTP	Glycolipid transfer protein (GLTP)	0	0	2	3	-1,4	-1,6
COPS2	COP9 signalosome complex subunit 2 (SGN2)	0	0	2	3	-1,4	-1,6
FIS1	Mitochondrial fission 1 protein	0	0	2	3	-1,4	-1,6
SURF4	Surfeit locus protein 4	0	0	2	3	-1,4	-1,6
SNX4	Sorting nexin-4	0	0	2	3	-1,4	-1,6
LPCAT3	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	0	0	2	3	-1,4	-1,6
RASA1	Ras GTPase-activating protein 1 (GAP)	0	0	2	3	-1,4	-1,6
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1	0	0	2	3	-1,4	-1,6
DDX19A	ATP-dependent RNA helicase DDX19A	0	0	2	3	-1,4	-1,6
GNPDA2	Glucosamine-6-phosphate isomerase 2	0	0	2	3	-1,4	-1,6
A1BG	Alpha-1B-glycoprotein (Alpha-1-B glycoprotein)	0	0	2	3	-1,4	-1,6
TXNL1	Thioredoxin-like 1	0	0	2	3	-1,4	-1,6
CECR5	Cat eye syndrome chromosome region	0	0	2	3	-1,4	-1,6
RPL14	60S ribosomal protein L14	1	3	2	3	-1,4	-2,9
NSUN2	NOP2/Sun RNA methyltransferase family	0	0	5	7	-1,4	-1,6
ELAVL1	ELAV-like protein 1 (Hu-antigen R) (HuR)	0	0	5	7	-1,4	-1,6
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	0	0	5	7	-1,4	-1,6
COPS4	COP9 signalosome complex subunit 4 (SGN4)	0	0	5	7	-1,4	-1,6
RPL37A	60S ribosomal protein L37a	0	0	5	7	-1,4	-1,6
RPL27A	60S ribosomal protein L27a	0	1	5	7	-1,4	-2,8
RPL7A	60S ribosomal protein L7a (PLA-X polypeptide)	2	2	8	11	-1,4	-1,6
HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2	0	11	15	-1,4	1,7
FASN	Fatty acid synthase	16	9	43	58	-1,4	1,1
C3	Complement C3	0	0	10	14	-1,4	-1,6
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein	28	12	28	39	-1,4	1,4
HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	1	0	12	17	-1,4	1,2
CSE1L	Exportin-2 (Exp2)	0	0	12	17	-1,4	-1,6
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	20	43	12	17	-1,4	-3,3
CAPNS1	Calpain, small subunit 1	0	0	4	6	-1,4	-1,6
SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	0	0	4	6	-1,4	-1,6
DPP3	Dipeptidyl-peptidase 3	0	0	4	6	-1,4	-1,6
DDX6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0	0	4	6	-1,4	-1,6
RPL30	60S ribosomal protein L30	0	0	4	6	-1,4	-1,6
LETM1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1	0	0	4	6	-1,4	-1,6
HRSP12	Uncharacterized protein	0	0	4	6	-1,4	-1,6
COPS7A	COP9 signalosome complex subunit 7a (SGN7a)	0	0	4	6	-1,4	-1,6
PLIN3	Perilipin	0	0	4	6	-1,4	-1,6
ACSL3	Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 3	0	0	4	6	-1,4	-1,6
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	0	0	9	13	-1,5	-1,6

RAB10	Ras-related protein Rab-10	13	4	6	9	-1,5	1,8
RPS6	40S ribosomal protein S6 (Phosphoprotein NP33)	0	0	6	9	-1,5	-1,6
NOP2	Uncharacterized protein	0	0	6	9	-1,5	-1,6
RPS19	40S ribosomal protein S19	0	1	6	9	-1,5	-2,8
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	6	5	8	12	-1,5	-1,3
LMNB1	LMNB1 protein	0	0	8	12	-1,5	-1,6
ITGA6	integrin, alpha 6	30	6	1	2	-1,5	2,8
SLC6A6	Sodium- and chloride-dependent taurine	3	0	1	2	-1,5	2,2
RPS5	40S ribosomal protein S5	0	0	1	2	-1,5	-1,6
PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	0	0	1	2	-1,5	-1,6
NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	0	0	1	2	-1,5	-1,6
GTF2I	General transcription factor II-I (GTFII-I) (TFII-I)	0	0	1	2	-1,5	-1,6
SRRT	Serrate RNA effector molecule homolog	0	0	1	2	-1,5	-1,6
TJP1	Tight junction protein ZO-1	0	0	1	2	-1,5	-1,6
MCCC2	2-methylcrotonoyl-CoA carboxylase	0	0	1	2	-1,5	-1,6
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran)	4	2	10	15	-1,5	1,0
PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha	0	0	10	15	-1,5	-1,6
VPS4B	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	3	0	3	5	-1,5	2,2
TXN	Thioredoxin (Fragment)	3	1	3	5	-1,5	1,2
SNRNP200	Small nuclear ribonucleoprotein	0	0	3	5	-1,5	-1,6
ACAT2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic,	0	0	3	5	-1,5	-1,6
PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	0	0	3	5	-1,5	-1,6
VPS26A	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	0	0	3	5	-1,5	-1,6
SRP72	Signal recognition particle subunit SRP72 (SRP72)	0	0	3	5	-1,5	-1,6
TOR1AIP1	Uncharacterized protein	0	0	3	5	-1,5	-1,6
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1)	1	4	3	5	-1,5	-3,6
RAB6A	Ras-related protein Rab-6A	9	1	5	8	-1,5	2,9
HNRNP1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	0	0	5	8	-1,5	-1,6
HAT1	Histone acetyltransferase 1	0	0	5	8	-1,5	-1,6
RBM39	RNA-binding protein 39	0	0	5	8	-1,5	-1,6
RPS24	40S ribosomal protein S24	1	0	7	11	-1,6	1,2
EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I (eIF-4A-I)	12	18	27	42	-1,6	-2,3
RPS16	40S ribosomal protein S16	0	0	8	13	-1,6	-1,6
ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2	0	0	8	13	-1,6	-1,6
FKBP4	Uncharacterized protein	1	1	8	13	-1,6	-1,6
EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	0	0	6	10	-1,6	-1,6
RPL23	60S ribosomal protein L23	0	0	4	7	-1,6	-1,6
PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	0	0	4	7	-1,6	-1,6
NOP56	Nucleolar protein 56 (Nucleolar protein 5A)	0	0	4	7	-1,6	-1,6
GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	0	0	4	7	-1,6	-1,6
FLNB	Filamin-B	6	14	41	65	-1,6	-3,3
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase	8	4	11	18	-1,6	1,1
PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	1	2	11	18	-1,6	-2,2
CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	0	3	11	18	-1,6	-5,3
VARS	Valyl-tRNA synthetase	0	0	9	15	-1,7	-1,6
AP2B1	AP-2 complex subunit beta (AP105B)	1	0	7	12	-1,7	1,2
EIF4A3	EIF4A3 - Eukaryotic initiation factor 4A-III	0	0	7	12	-1,7	-1,6
RPL18	Ribosomal protein L18	7	11	7	12	-1,7	-2,3
ALCAM	CD166 antigen	20	0	2	4	-1,7	11,0
RAB21	Ras-related protein Rab-21	8	0	2	4	-1,7	4,8
Abcc4	ATP-binding cassette protein C4	5	0	2	4	-1,7	3,2
ARPC5L	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like	3	0	2	4	-1,7	2,2
NDRG1	N-Myc downstream regulated gene 1	12	4	2	4	-1,7	1,6
EPHA2	Uncharacterized protein	19	11	2	4	-1,7	1,1
DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	6	5	2	4	-1,7	-1,3
SLC2A3	Solute carrier family 2	9	8	2	4	-1,7	-1,4
ARHGAP1	Cdc42 GTPase-activating protein	0	0	2	4	-1,7	-1,6
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1 (EC 3.6.4.-)	0	0	2	4	-1,7	-1,6
RRP12	Uncharacterized protein	0	0	2	4	-1,7	-1,6
FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related	0	0	2	4	-1,7	-1,6
VAPB	Vesicle-associated membrane	0	0	2	4	-1,7	-1,6
LOC100855463	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	0	0	2	4	-1,7	-1,6
DRG2	Developmentally-regulated GTP-binding protein	0	0	2	4	-1,7	-1,6
SLC25A1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0	0	2	4	-1,7	-1,6
CASP10	Caspase-10	0	0	2	4	-1,7	-1,6
TOMM22	Translocase of outer mitochondrial membran	0	0	2	4	-1,7	-1,6
DERA	Deoxyribose-phosphate aldolase (putative)	0	0	2	4	-1,7	-1,6
EZR	Ezrina	34	43	31	52	-1,7	-2,0
RUVBL2	RuvB-like AAA ATPase 2	3	0	12	21	-1,8	2,2
THBS1	Thrombospondin 1	3	2	3	6	-1,8	-1,2
PPA1	Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)	0	0	3	6	-1,8	-1,6

NCBP1	Nuclear cap-binding protein subunit 1	0	0	3	6	-1,8	-1,6
IPO7	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7)	0	0	10	18	-1,8	-1,6
KRT18	Uncharacterized protein (Fragment)	1	19	31	54	-1,8	-14,1
DHX15	Putative pre-mRNA-splicing factor	0	0	7	13	-1,8	-1,6
HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	0	0	4	8	-1,8	-1,6
PDCD6	Programmed cell death protein 6	6	0	0	1	-1,9	3,7
STK10	Serine/threonine-protein kinase 10 (EC 2.7.11.1)	2	0	0	1	-1,9	1,7
BCAM	Basal cell adhesion molecule	3	1	0	1	-1,9	1,2
SH3GL1	Endophilin-A2 (Endophilin-2)	1	0	0	1	-1,9	1,2
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	4	2	0	1	-1,9	1,0
SLC16A1	Monocarboxylate transporter 1	10	6	0	1	-1,9	-1,0
ITGA2	Integrin, alpha 2	24	24	0	1	-1,9	-1,6
BROX	BRO1 domain and CAAX motif containing	6	7	0	1	-1,9	-1,8
SDCBP	Syntenin-1	6	10	0	1	-1,9	-2,4
MUC16	Mucin 16, cell surface associated	7	12	0	1	-1,9	-2,5
SLC9A3R1	Solute carrier family 9, subfamily A	6	15	0	1	-1,9	-3,5
EPS8L1	Epidermal growth factor receptor kinase	0	10	0	1	-1,9	-14,0
STAT1	Signal transducer and activator of transcription	0	0	6	12	-1,9	-1,6
PAICS	Multifunctional protein ADE2	1	0	8	16	-2,0	1,2
NCKAP1	Nck-associated protein 1 (NAP 1)	10	0	1	3	-2,0	5,8
RAB5A	Ras-related protein Rab-5A	7	2	1	3	-2,0	1,6
PUF60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	0	0	1	3	-2,0	-1,6
TEX10	Testis-expressed sequence 10 protein	0	0	1	3	-2,0	-1,6
UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (EC 6.3.2.19)	0	0	1	3	-2,0	-1,6
CAB39	Calcium-binding protein 39 (MO25alpha)	0	0	1	3	-2,0	-1,6
TAGLN	Transgelin (22 kDa actin-binding protein)	0	0	1	3	-2,0	-1,6
PPP6C	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic	0	0	1	3	-2,0	-1,6
TBCD	Uncharacterized protein (Fragment)	0	0	1	3	-2,0	-1,6
TTLL12	Uncharacterized protein	0	0	13	26	-2,0	-1,6
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	13	7	2	5	-2,0	1,1
EHD1	Uncharacterized protein	17	13	2	5	-2,0	-1,2
EIF4G2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	0	0	2	5	-2,0	-1,6
MCM5	Uncharacterized protein	0	0	2	5	-2,0	-1,6
SNX1	Sorting nexin-1	0	0	2	5	-2,0	-1,6
ABCF1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	0	0	2	5	-2,0	-1,6
RPL21	60S ribosomal protein L21	0	1	2	5	-2,0	-2,8
CLDN4	Claudin	1	4	2	5	-2,0	-3,6
RPL8	60S ribosomal protein L8	0	0	3	7	-2,0	-1,6
DDB1	DNA damage-binding protein 1	0	0	3	7	-2,0	-1,6
XPOT	Exportin-T (Exportin(tRNA)) (tRNA exportin)	0	0	3	7	-2,0	-1,6
IDE	Insulin-degrading enzyme (EC 3.4.24.56)	0	0	3	7	-2,0	-1,6
FKBP8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	0	0	3	7	-2,0	-1,6
CTNND1	Catenin delta-1	4	6	3	7	-2,0	-2,1
CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	10	3	4	9	-2,0	1,7
ITGB4	Integrin beta	11	9	4	9	-2,0	-1,3
QARS	Glutamyl-tRNA synthetase	0	0	4	9	-2,0	-1,6
SPTAN1	Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1	0	1	8	17	-2,1	-2,8
RPS14	40S ribosomal protein S14	0	2	5	12	-2,2	-4,0
PSME2	Proteasome activator complex subunit 2	0	0	3	8	-2,3	-1,6
LMO7	LIM domain only protein 7	0	0	3	8	-2,3	-1,6
MYO1E	MYO1E myosin IE	1	0	2	6	-2,3	1,2
SLC2A1	Solute carrier family 2,	9	8	2	6	-2,3	-1,4
H2AFY	Core histone macro-H2A.1 (Histone macroH2A1)	0	0	2	6	-2,3	-1,6
C1QBP	Complement component 1 Q	0	0	2	6	-2,3	-1,6
INF2	INF2 inverted formin	0	0	2	6	-2,3	-1,6
PRPF8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	0	0	5	13	-2,4	-1,6
HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	0	0	1	4	-2,4	-1,6
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)	0	0	1	4	-2,4	-1,6
AP1M2	Adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	0	0	1	4	-2,4	-1,6
MTHFD1L	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase	0	0	1	4	-2,4	-1,6
TOP1	TOP1 topoisomerase (DNA) I	0	0	1	4	-2,4	-1,6
QDPR	Dihydropteridine reductase (EC 1.5.1.34)	0	0	1	4	-2,4	-1,6
RPS21	40S ribosomal protein S21	0	0	1	4	-2,4	-1,6
EMG1	N1-specific pseudouridine methyltransferase	0	0	1	4	-2,4	-1,6
HDAC2	Histone deacetylase 2 (HD2) (EC 3.5.1.98)	0	0	1	4	-2,4	-1,6
OAT	OAT - ornithine aminotransferase	0	0	4	11	-2,4	-1,6
CTSD	Cathepsin D (EC 3.4.23.5)	2	0	6	16	-2,5	1,7
KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14)	15	11	6	16	-2,5	-1,2
KRT8	Keratin 8, type II	6	25	36	90	-2,6	-5,7
ANXA3	Annexin	2	0	4	12	-2,6	1,7
RAB5B	Ras-related protein Rab-5B	6	2	2	7	-2,7	1,4



TNRC6B	Trinucleotide repeat-containing gene 6B	1	0	2	7	-2,7	1,2
PSMB4	Proteasome subunit beta type-4 (EC 3.4.25.1	0	0	2	7	-2,7	-1,6
HSPB1	Heat shock protein beta-1 (HspB1)	0	0	2	7	-2,7	-1,6
PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase	0	0	2	7	-2,7	-1,6
PLXNB2	Plexin-B2	11	0	0	2	-2,7	6,3
PPP1CA	Coronin	1	0	0	2	-2,7	1,2
RAB18	Ras-related protein Rab-18	1	0	0	2	-2,7	1,2
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	0	0	0	2	-2,7	-1,6
SGPL1	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	0	0	0	2	-2,7	-1,6
TRIP13	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	0	0	0	2	-2,7	-1,6
GALE	UDP-galactose-4-epimerase	0	0	0	2	-2,7	-1,6
GPS1	G protein pathway suppressor 1	0	0	0	2	-2,7	-1,6
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	0	0	0	2	-2,7	-1,6
TMPRSS11E	Transmembrane protease, serine 11E	0	0	0	2	-2,7	-1,6
ALDH9A1	Uncharacterized protein	0	0	0	2	-2,7	-1,6
RPL32	60S ribosomal protein L32	0	0	0	2	-2,7	-1,6
GPRC5A	Retinoic acid-induced protein 3	4	9	0	2	-2,7	-3,0
BAIAP2L1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	0	5	0	2	-2,7	-7,8
TFRC	Transferrin receptor protein 1 (TR) (TfR) (TfR1)	14	19	5	15	-2,7	-2,1
BZW1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing	3	0	4	13	-2,8	2,2
REP15	RAB15 effector protein	2	0	1	5	-2,9	1,7
EIF3D	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0	0	1	5	-2,9	-1,6
TWF2	Twinfilin actin binding protein 2	0	0	1	5	-2,9	-1,6
PYROXD1	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	0	0	1	5	-2,9	-1,6
RPL26	60S ribosomal protein L26	0	0	1	5	-2,9	-1,6
EML2	Echinoderm microtubule associated protein like	0	0	2	8	-3,0	-1,6
RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase	0	0	2	8	-3,0	-1,6
SERPINB1	Leukocyte elastase inhibitor (LEI)	0	0	2	8	-3,0	-1,6
PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	0	0	3	11	-3,0	-1,6
VPS29	Vacuolar protein sorting 29 homolog	1	0	1	6	-3,4	1,2
MYO1D	Myogenic differentiation 1	1	0	1	6	-3,4	1,2
USP4	Ubiquitin carboxy-terminal hidrolasa 4	0	0	0	3	-3,6	-1,6
EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2	0	0	0	3	-3,6	-1,6
PPAT	Amidophosphoribosyltransferase (ATase)	0	0	0	3	-3,6	-1,6
EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B	0	0	0	3	-3,6	-1,6
HNRNPUL2	Uncharacterized protein	0	0	0	3	-3,6	-1,6
RBBP7	Histone-binding protein RBBP7	0	0	0	3	-3,6	-1,6
UBA3	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	0	0	0	3	-3,6	-1,6
MAP1S	Microtubule-associated protein 1S	0	0	0	3	-3,6	-1,6
DIS3	Exosome complex exonuclease RRP44	0	0	0	3	-3,6	-1,6
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H (EC 6.3.2.19)	0	0	0	3	-3,6	-1,6
AP3D1	Subunit of the AP3 adaptor-like complex	0	0	0	3	-3,6	-1,6
CLUH	Clustered mitochondria protein homolog	0	0	0	3	-3,6	-1,6
CLINT1	Clathrin interactor 1 (Epsin-4)	0	0	0	3	-3,6	-1,6
MSH2	MSH2 - DNA mismatch repair protein Msh2	0	0	0	3	-3,6	-1,6
SQRDL	Sulfide quinone reductase-like	0	0	0	3	-3,6	-1,6
NUP205	Nucleoporin 205kDa	0	0	0	3	-3,6	-1,6
EPS8L2	EPS8-like 2	0	1	0	3	-3,6	-2,8
DSG3	Desmoglein-3	0	1	0	3	-3,6	-2,8
CDH1	Cadherin-1 (Epithelial cadherin) (E-cadherin)	0	4	0	3	-3,6	-6,5
CTNNA1	CTNNA1 catenin (cadherin-associated protein)	7	15	3	14	-3,8	-3,1
TWF1	Twinfilin actin binding protein 1	1	0	1	7	-3,8	1,2
DNM2	Dynamin-2 (EC 3.6.5.5)	0	0	1	7	-3,8	-1,6
ANXA7	Annexin	18	1	0	4	-4,4	5,5
SLC1A5	Solute carrier family 1	11	7	0	4	-4,4	-1,0
EIF3K	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0	0	0	4	-4,4	-1,6
LARP1	La-related protein 1	0	0	0	4	-4,4	-1,6
TRIM25	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	0	0	0	4	-4,4	-1,6
LOC100852224	Uncharacterized protein	0	0	0	4	-4,4	-1,6
PPL	Periplakin	0	0	0	4	-4,4	-1,6
BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	0	0	0	4	-4,4	-1,6
GLOD4	Glyoxalase domain containing 4	0	0	0	4	-4,4	-1,6
UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	0	0	0	4	-4,4	-1,6
LAMC2	Laminin, gamma 2	0	0	0	4	-4,4	-1,6
LAMB3	Laminin, beta 3	0	5	0	4	-4,4	-7,8
TSTA3	GDP-L-fucose synthetase	0	0	0	5	-5,2	-1,6
SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor	0	0	0	5	-5,2	-1,6
ACY1	Aminoacylase 1	0	0	0	5	-5,2	-1,6
TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	0	0	0	5	-5,2	-1,6
BAG6	BAG6 BCL2-associated athanogene 6	0	0	0	5	-5,2	-1,6
TOMM40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40	0	0	0	5	-5,2	-1,6

PFAS	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	0	0	0	5	-5,2	-1,6
EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	0	0	1	10	-5,2	-1,6
KRT14	Cytokeratin-14 (CK-14)	9	0	3	22	-5,7	5,3
COPG2	Coatomer subunit gamma-2	2	0	0	6	-6,1	1,7
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	0	0	0	6	-6,1	-1,6
ESRP1	Epithelial splicing regulatory protein 1	0	0	0	6	-6,1	-1,6
EML4	EML4-ALK positive lung cancer	0	0	0	6	-6,1	-1,6
TES	Testin	0	0	0	6	-6,1	-1,6
CTNNB1	Catenin beta-1 (Beta-catenin)	0	13	0	6	-6,1	-17,8
PLA2G7	Platelet-activating factor acetylhydrolase	3	0	0	7	-6,9	2,2
RAB8A	Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel)	12	4	0	7	-6,9	1,6
DDX47	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	0	0	0	7	-6,9	-1,6
LLGL2	LLGL2 lethal giant larvae homolog 2	0	1	0	7	-6,9	-2,8
ISG15	Interferon-induced 17 kDa	0	0	0	8	-7,7	-1,6
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	0	17	0	8	-7,7	-22,8
DSP	Desmoplakin	1	0	0	10	-9,4	1,2
AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1	0	0	0	10	-9,4	-1,6
TGM2	Transglutaminase 2	0	0	0	11	-10,3	-1,6
SPTBN1	SPTBN1 spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0	0	3	41	-10,4	-1,6
ANXA6	Annexin (Fragment)	0	0	0	13	-11,9	-1,6
KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19	5	14	5	74	-12,7	-3,8
JUP	Junction plakoglobin (Catenin gamma)	14	15	0	15	-13,6	-1,7
EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II (eIF-4A-II)	0	0	0	23	-20,3	-1,6
JUP	Junction plakoglobin	13	16	0	27	-23,7	-1,9
KRT7	Keratin, type I cytoskeletal 7	0	12	0	68	-58,3	-16,5



